



Facultad de Veterinaria

Trabajo de  
Fin de Grado

Enteropatógenos parasitarios  
implicados en la diarrea  
neonatal del ternero

Marta Conde Fontenla

**Grado en Veterinaria**

Año 2017/18

Modalidad del trabajo: Experimental

# Licencia

Esta obra pertenece a Marta Conde Fontenla, y está sujeta a la licencia Reconocimiento-Compartir Igual 4.0 Internacional de Creative Commons. Para ver una copia de esta licencia, visite <http://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>



## RESUMEN

### **Enteropatógenos parasitarios implicados en la diarrea neonatal del ternero.**

Las diarreas neonatales constituyen un problema grave y muy frecuente en los terneros lactantes. Se trata de un proceso multifactorial, causado por enteropatógenos bacterianos, víricos o parasitarios, que origina cuantiosas pérdidas económicas directas e indirectas en las explotaciones. Además de las repercusiones sobre la salud de los animales, algunos de los agentes implicados pueden provocar también problemas de Salud Pública.

Los objetivos de este trabajo fueron determinar la prevalencia de varios agentes parasitarios (*Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp y *Eimeria* spp.) en terneros lactantes con diarrea y establecer la posible influencia de dos variables intrínsecas (edad y consistencia de las heces) sobre el porcentaje de infección y la eliminación media de quistes/ooquistes. Para ello se recogieron 84 muestras fecales de terneros menores de 30 días de edad con diarrea pertenecientes a 48 explotaciones de Galicia. La presencia de coccidios eiméricos se realizó mediante el método McMaster, mientras que la identificación de quistes de *Giardia* spp. y ooquistes de *Cryptosporidium* spp. se realizó con una técnica de inmunofluorescencia directa comercial (Aqua Glo G/C), aunque en este caso las formas parasitarias se concentraron previamente mediante una técnica de sedimentación difásica. Además, la presencia de *Cryptosporidium* spp. se detectó también mediante la tinción negativa de Heine, más rápida y sencilla, y los resultados se compararon con los obtenidos con inmunofluorescencia.

En el 64,3% (54/84) de los animales se detectó al menos uno de los parásitos estudiados; *Cryptosporidium* spp. fue el protozoo más prevalente (54,8%), seguido por *Giardia* spp. (19,1%) y *Eimeria* spp. (11,9%). Las infecciones simples fueron más frecuentes (72,2%) que las dobles (22,2%) y las triples (5,6%). La prevalencia de infección por *Giardia* spp. y *Eimeria* spp. se incrementó significativamente con la edad de los animales; los porcentajes de infección por *Cryptosporidium* spp. fueron más elevados en la segunda y tercera semana de vida, pero las diferencias no fueron significativas. El porcentaje de muestras positivas a *Cryptosporidium* spp. fue superior en las heces líquidas, al contrario que en *Giardia* spp. y *Eimeria* spp., pero estas diferencias no fueron significativas.

Por último la concordancia entre los resultados de la tinción negativa de Heine y la inmunofluorescencia para la detección de *Cryptosporidium* spp. puede considerarse débil-moderada; sin embargo, cuando las heces son líquidas, la tinción de Heine presenta una mejor sensibilidad, pues la concordancia es buena.

**Palabras clave:** *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Eimeria*, Terneros, Diarrea neonatal, Galicia

## RESUMO

### Enteropatóxenos parasitarios implicados na diarrea neonatal do tenreiro

As diarreas neonatales constitúen un problema grave e frecuente nos tenreiros lactantes. Trátase dun proceso multifactorial, causado por enteropatóxenos bacterianos, víricos ou parasitarios, que orixinan cuantiosas perdas económicas directas e indirectas nas explotacións. Ademais das repercusións sobre a saúde dos animais, algúns dos axentes implicados poden provocar tamén problemas de Saúde Pública.

Os obxetivos deste traballo foron determinar a prevalencia de varios axentes parasitarios (*Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp y *Eimeria* spp.) en tenreiros lactantes con diarrea e establecer a posíbel influencia de dúas variábeis intrínsecas (idade e consistencia das feces) sobre a porcentaxe de infección e a eliminación media de quistes/ooquistes. Para elo recolléronse 84 mostras fecais de tenreiros menores de 30 días de idade con diarrea pertencentes a 48 explotacións de Galicia. A presenza de coccidios eiméridos realizouse mediante o método McMaster, mentras a identificación de quistes de *Giardia* spp. e ooquistes de *Cryptosporidium* spp. realizouse cunha técnica de inmunofluorescencia directa comercial (Aqua Glo G/C), aínda que neste caso as formas parasitarias concentráronse previamente mediante unha técnica de sedimentación difásica. Ademais, a presenza de *Cryptosporidium* spp. detectouse tamén mediante a tinguadura negativa de Heine, máis rápida e sinxela, e os resultados comparáronse cos obtidos coa inmunofluorescencia.

No 64,3% (54/84) dos animais detectouse alomenos un dos parásitos estudados; *Cryptosporidium* spp. foi o protozoo máis prevalente (54,8%), seguido por *Giardia* spp. (19,1%) e *Eimeria* spp. (11,9%). As infeccións simples foron máis frecuentes (72,2%) cas dobres (22,2%) e as triples (5,6%). A prevalencia de infección por *Giardia* spp. e *Eimeria* spp. incrementouse significativamente coa idade dos animais; as porcentaxes de infección por *Cryptosporidium* spp. foron máis elevadas na segunda e terceira semana de vida, mais as diferenzas non foron significativas. A porcentaxe de mostras positivas a *Cryptosporidium* spp. foi superior nas feces líquidas, ao contrario que en *Giardia* spp. e *Eimeria* spp., mais estas diferenzas non foron significativas.

Por último, a concordancia entre os resultados da tinguadura negativa de Heine e a inmunofluorescencia para a detección de *Cryptosporidium* spp. pódese considerar débil-moderada; sen embargo, cando as feces son líquidas, a tinguadura de Heine presenta unha mellor sensibilidade, pois a concordancia é boa.

**Palabras chave:** *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Eimeria*, Tenreiros, Diarrea neonatal, Galicia

## ABSTRACT

### Parasitic enteropathogens causing neonatal calf diarrhoea

Neonatal diarrhoea is a serious and very common problem in nursing calves. This is a multifactorial process, caused by bacterial, viral or parasitic enteropathogens, which results in substantial direct and indirect economic losses in farms. In addition to their impact on animal health, some of the agents involved may cause public health problems.

The aim of this work is twofold: first, to determine the prevalence of various parasitic agents, i.e., *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp., and *Eimeria* spp. in nursing calves with diarrhoea, and second, to assess the potential influence that two intrinsic variables, i.e., age and consistency of faeces, may have on the percentage of infection and the average elimination of cysts/oocysts. To this aim, 84 faecal samples were collected from calves with diarrhoea, younger than 30 days of age, from 48 farms in Galicia, Spain. The presence of eimeriid coccidia was determined by means of the McMaster method, while the identification of *Giardia* spp. cysts and of *Cryptosporidium* spp. oocysts was carried out with a commercial direct immunofluorescence technique, i.e., Aqua Glo G/C, although in this latter case, parasitic forms were previously concentrated by means of a diphasic sedimentation technique. In addition, the presence of *Cryptosporidium* spp. was detected by Heine's negative stain, a quicker and easier technique, and the results thereof were compared against those obtained by immunofluorescence.

At least one of the parasites studied was detected in 64,3% (54/84) of the animals; specifically, *Cryptosporidium* spp. was the most prevalent protozoan (54,8%), followed by *Giardia* spp. (19,1%) and *Eimeria* spp. (11,9%). Simple infections were more frequent (72,2%) than double (22,2%) and triple (5,6%) infections. The prevalence of infections with *Giardia* spp. and *Eimeria* spp. increased significantly with the age of the animals; the percentage of infection with *Cryptosporidium* spp. was higher in the second and third week of life, but differences were not significant. Unlike *Giardia* spp. and *Eimeria* spp., the percentage of samples positive for *Cryptosporidium* spp. was higher in the liquid faeces, but these differences were not significant.

Finally, the concordance between the results for the detection of *Cryptosporidium* spp. of Heine's negative staining and those of immunofluorescence can be considered weak to moderate; when the stools are liquid, however, Heine's staining is more sensitive, given that the concordance between results is good.

**Keywords:** *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Eimeria*, Calves, Neonatal diarrhoea, Galicia

## ÍNDICE

<b>1. Revisión bibliográfica.....</b>	<b>7</b>
1.1. Diarreas neonatales del ternero .....	7
1.1.1. Prevalencia e importancia .....	7
1.1.2. Agentes etiológicos implicados.....	8
1.2. Enteropatógenos estudiados .....	10
1.2.1. <i>Cryptosporidium</i> spp. ....	10
1.2.2. <i>Giardia</i> spp.....	14
1.2.3. <i>Eimeria</i> spp. ....	18
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>21</b>
<b>3. Materiales y métodos.....</b>	<b>21</b>
3.1. Toma de muestras.....	21
3.2. Técnicas empleadas.....	21
3.2.1. Tinción negativa de Heine.....	22
3.2.2. Técnica de flotación .....	22
3.2.2.1. Identificación específica de ooquistes de <i>Eimeria</i> spp.....	23
3.2.3. Inmunofluorescencia directa (IFAT).....	24
3.3. Análisis de los factores de riesgo .....	26
<b>4. Resultados y discusión.....</b>	<b>27</b>
4.1. Prevalencias e intensidad de eliminación .....	27
4.2. Asociaciones entre los distintos patógenos .....	31
4.3. Factores estudiados .....	32
4.3.1. Edad de los animales .....	33
4.3.2. Estado de las heces.....	38
4.4. Comparación entre las técnicas empleadas para la detección de ooquistes de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	42
<b>5. Conclusiones.....</b>	<b>43</b>
<b>6. Bibliografía.....</b>	<b>44</b>

## 1. Revisión bibliográfica

### 1.1. Diarreas neonatales del ternero

#### 1.1.1. Prevalencia e importancia

El sector ganadero, como aquellos otros que integran el sector primario, es uno de los pilares fundamentales de la economía de España. En este sentido, en 2017 el sector bovino en nuestro país estaba integrado por 6.727.696 animales, siendo España el sexto país europeo con mayor censo tras Francia, Alemania, Reino Unido, Irlanda e Italia (MAPAMA, 2017). En 2017 había censadas en nuestra comunidad 946.353 cabezas de vacuno, ocupando la segunda posición solo por detrás de Castilla y León. Por tanto, en cuanto a producción lechera, Galicia tiene un importante peso, representando un 42,8% del total de la producción española (MAPAMA, 2017). Desde el punto de vista productivo, es esencial que los ganaderos inviertan en una buena genética, aunque sin descuidar la sanidad y el bienestar, porque de nada sirve poseer animales potencialmente muy productivos si están enfermos. Por ello es especialmente importante que las explotaciones de ganado vacuno presenten unos estándares de sanidad y bienestar elevados para poder competir en el mercado europeo.

En este sentido, se ha señalado que la causa que produce mayores pérdidas económicas a las explotaciones de ganado vacuno en la etapa que va desde el nacimiento hasta el destete son los procesos diarreicos (Torsein *et al.*, 2011). Las diarreas neonatales son un problema frecuente y de gran importancia para las ganaderías, pues conllevan notables mermas económicas indirectas derivadas del retraso en el crecimiento y menor ganancia de peso diaria; se estima que los animales que han sufrido un proceso diarreico nunca alcanzarán su máximo productivo, estimándose este retraso del crecimiento en un 18% (García Meniño *et al.*, 2014). Otro aspecto a considerar es la mayor susceptibilidad de padecer otras patologías, como neumonías, que muestran los animales que superan la enfermedad (García-Meniño *et al.*, 2014). Además, también supone ciertos costes directos, que son consecuencia de la administración de tratamientos y, especialmente, de la mortalidad juvenil, pues estos procesos se consideran la principal causa de mortalidad en terneros de menos de un año de edad, pudiendo alcanzar el 75% en animales menores de 3 semanas (González y Astiz, 2005; de la Fuente *et al.*, 1998; Silverlås *et al.*, 2010; García-Meniño *et al.*, 2014).

Numerosos estudios realizados en España demuestran la importancia de este síndrome diarreico en el ganado vacuno, con prevalencias muy elevadas que oscilan entre el 57,8% y el 82% (de la Fuente *et al.*, 1998; Quílez *et al.*, 2008; García-Meniño *et al.*, 2014). Además estos procesos pueden tener repercusiones en materia de Salud Pública, pues gran parte de los patógenos relacionados con la aparición de diarrea en terneros neonatos son zoonóticos,

pudiendo provocar la enfermedad también a los seres humanos (Šlapeta, 2013; Chako *et al.*, 2010; Feng y Xiao, 2011).

### 1.1.2. Agentes etiológicos implicados

La etiología de la diarrea neonatal del ternero es compleja, y sus causas se suelen clasificar como infecciosas o específicas y no infecciosas o inespecíficas. Las primeras, son aquellas producidas por la acción de enteropatógenos bacterianos, víricos o parasitarios, que pueden actuar aisladamente o combinados. Por el contrario, las no infecciosas son consecuencia de errores de manejo, principalmente de carácter nutricional (Tabla 1).

**Tabla 1.** Tipos de diarrea neonatales según su etiología

Infecciosas	Bacteriana	<i>E.coli</i>
		<i>Salmonella</i>
Infecciosas	Vírica	<i>C. perfringens</i>
		Rotavirus
		Coronavirus
		Torovirus
		Nebovirus
		Norovirus
		Astrovirus
	Parasitaria	<i>Cryptosporidium</i>
		Coccidiosis (género <i>Eimeria</i> )
		<i>Giardia</i>
		<i>Toxocara vitulorum</i>
No infecciosas	Nutricional	Cambio brusco en la cantidad de leche (empachos)
		Fallo-deficiencia en cantidad-calidad del lactorreemplazante
		Fallo de manejo en la administración del lactoreemplazante
		Fallo en el destete
	Motora	Diarreas leves y benignas
	Intolerancia a la leche	Déficit parcial o total de lactasa
	Disbiosis yatrogénica: infecciosa secundaria	
No infecciosas	Hipersensibilidad a la proteína de soja en sustitutivos lácteos	



En este trabajo nos centraremos en las diarreas infecciosas, que se consideran enfermedades multifactoriales, pues su aparición depende de la presencia de diferentes variables, que comprenden desde el estado inmunológico hasta el manejo del rebaño. Por este motivo, los agentes patógenos causantes de diarreas en el ganado vacuno se han identificado tanto en animales con signos clínicos como en aquellos sintomatológicamente sanos (Castro-Hermida *et al.*, 2002; Silverlås *et al.*, 2010), observándose también variaciones entre la duración y momento de aparición de la diarrea en los animales (Fayer *et al.*, 1998). Todo ello complica notablemente el diagnóstico del agente etiológico primario en la práctica clínica, siendo necesario remitir muestras al Laboratorio para identificar el/los enteropatógeno/s implicados.

Pueden diferenciarse tres factores implicados en el desarrollo de la enfermedad y que condicionan el curso del síndrome diarreico:

✓ *Estado inmunitario*

La aparición de diarreas se relaciona con un deficiente estado inmunitario del animal (Svensson *et al.*, 2003). Posiblemente, el factor que más influye en la adquisición de una adecuada inmunidad de los terneros es la correcta toma de calostro en las primeras horas de vida, siendo especialmente importantes el manejo durante el encalostrado, así como la cantidad, calidad, tiempo y vía de administración (artificial o natural) (Reschke *et al.*, 2017). En este sentido, adquiere gran importancia el manejo de las madres, pues si se vacunan frente a rotavirus, coronavirus y *Escherichia coli*, los terneros recibirán una buena inmunidad pasiva frente a estos patógenos, reduciendo la aparición y/o gravedad de los signos clínicos (Svensson *et al.*, 2003; Torsein *et al.*, 2011). Además, ciertas condiciones en los establos, como una inadecuada temperatura, humedad o ventilación, y un mal manejo (hacinamiento, mezcla de lotes de diferentes edades) constituyen factores estresantes para los animales, lo que genera una cierta inmunodepresión y reduce la respuesta del animal frente a las infecciones, y por tanto, favorece la aparición de signos clínicos (Díaz *et al.*, 2014; García-Meniño *et al.*, 2014; Dauschies y Najdrowski, 2005).

✓ *Presión de infección*

La ingestión de un elevado número de patógenos en un periodo corto de tiempo se relaciona con la aparición de diarreas neonatales; por ello, estos procesos son más frecuentes en lugares con limpieza e higiene deficientes (Díaz *et al.*, 2014). La implantación de unas buenas medidas higiénicas, incluyendo un correcto plan de limpieza y desinfección, es esencial a la hora de reducir la contaminación ambiental. La zona de paridera se considera un punto crítico, ya que las madres presentan un incremento de la tasa de eliminación de formas infectantes durante el parto, favoreciendo la infección de los terneros al poco de nacer (Svensson, 1993; García-Meniño *et al.*, 2014). La desinfección de materiales como camas, cubos, tetinas, etc., y

todo aquello que entre en contacto con los terneros, es esencial para prevenir la aparición de procesos diarreicos en las granjas.

✓ *Agente patógeno*

Algunos de los enteropatógenos causantes de diarreas presentan mayor virulencia que otros; asimismo, dentro de una misma especie existen cepas más patógenas que otras (Torsein *et al.*, 2011). Finalmente, la presencia concomitante de varios patógenos agrava los cuadros clínicos (García-Meniño *et al.*, 2014).

## 1.2. Enteropatógenos parasitarios

En este trabajo se estudió la presencia de tres protozoos implicados en problemas gastrointestinales en el ganado vacuno: *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp., y *Eimeria* spp.

### 1.2.1. *Cryptosporidium* spp.

*Cryptosporidium* spp. es un parásito intracelular obligado que completa su ciclo biológico en un único hospedador tras varias fases de reproducción asexual y sexual (Díaz *et al.*, 2014). Taxonómicamente se incluye en el Phylum Apicomplexa, Orden Eimeriidae, Clase Coccidea, Familia Cryptosporidiidae, Género *Cryptosporidium*. Su distribución es mundial y su rango de hospedadores muy amplio, desde mamíferos, incluyendo al hombre, hasta anfibios y peces (Šlapeta, 2013). El ciclo se inicia cuando un hospedador potencial ingiere ooquistes del protozoo a través de presas parasitadas, agua, o fómites contaminados. Una vez en el tracto gastrointestinal se liberan los 4 esporozoítos móviles, que invaden activamente el borde luminal de los enterocitos. Allí experimentan dos fases de multiplicación asexual, que se denomina merogonia, y posteriormente completan una fase de reproducción sexual o gametogonia que dará lugar a macrogamontes (femeninos) y microgamontes (masculinos). Tras la fertilización se forman los ooquistes con 4 esporozoítos, rodeados por una gruesa pared trilaminar que los protege de condiciones ambientales adversas. Los ooquistes esporulan *in situ*, expulsándose al exterior con las heces ya maduros e infectantes (Fayer y Xiao, 2008). En ensayos experimentales se observó que aproximadamente un 20% de los ooquistes poseían una frágil pared de una sola membrana que se rompía en la luz intestinal; así, los esporozoítos liberados pueden infectar a los enterocitos adyacentes, haciendo posible la autoinfección (Current y Reese, 1986). El período de prepatencia varía según la especie de *Cryptosporidium* implicada y de las características del hospedador: en el ser humano oscila entre 4 y 22 días y 2-6 días en terneros; el período de patencia puede variar entre 1 y 20 días (Fayer y Xiao, 2008).

*Epidemiología*

En los años setenta, rotavirus era el patógeno implicado con mayor frecuencia en brotes de diarrea en terneros, mientras que *Cryptosporidium* spp. solo se identificaba en un pequeño porcentaje de casos de terneros con diarrea (Current y García, 1991; de Graaf *et al.*, 1999). Sin embargo, en los últimos años se ha observado un incremento significativo de las prevalencias de este protozoo, por lo que en la actualidad se reconoce como uno de los agentes patógenos primarios involucrado con mayor frecuencia en las diarreas neonatales de los terneros (Castro-Hermida *et al.*, 2006; Quílez *et al.*, 1996; de la Fuente *et al.*, 1998, 1999; García-Meniño *et al.*, 2014). Numerosos estudios a nivel mundial confirman la importancia de este parásito en el síndrome diarreico del ternero; en Europa las prevalencias de infección por este parásito oscilan entre el 19 y el 45,7% (Joachim *et al.*, 2003; Gillhuber *et al.*, 2014; Silverlås *et al.*, 2010), mientras que los estudios realizados en España muestran porcentajes mayores, como se observa en la Tabla 2.

**Tabla 2. Prevalencia de criptosporidiosis en terneros con diarrea de distintas zonas de España**

<b>Zona</b>	<b>Prevalencia</b>	<b>Autores</b>
	76%	(García Meniño, 2013)
Galicia	70%	(García Meniño <i>et al.</i> , 2014)
	53,4%	(Soilán, 2014)
Norte de España	57,8%	(Quílez <i>et al.</i> , 2008)
Centro de España	52,3%	(de la Fuente <i>et al.</i> , 1998)
León	35,7%	(Martín-Gómez <i>et al.</i> , 1995)
Aragón	64,7%	(Quílez <i>et al.</i> , 1996)

Esta alta prevalencia se debe a una serie de características que presenta este protozoo. Así, un animal infectado es capaz de excretar más de 10 millones de ooquistes por gramo de heces (opg); mientras que la dosis infectante necesaria para producir enfermedad es muy reducida; además, los ooquistes son extremadamente resistentes en el medio, pues toleran temperaturas de hasta 4°C durante 6 meses, así como la acción de multitud de desinfectantes químicos a las dosis habitualmente empleadas en las explotaciones, al ozono, y a la cloración del agua (Fayer y Xiao, 2008). En general, los factores que más influyen sobre la prevalencia de la criptosporidiosis son:

- La edad del animal: en numerosos estudios se ha observado que la etapa más crítica para los terneros es la neonatal, encontrándose las prevalencias más altas en los primeros 15 días de vida (Fayer y Xiao, 2008); los porcentajes de infección y la gravedad de los signos clínicos disminuye con la edad de los animales. Mantener los terneros en lotes de edades no homogéneas permite que los más mayores, reservorios asintomáticos, actúen como fuente de infección para los más jóvenes (Díaz *et al.*, 2014).

- El estado inmuninario del animal es un factor clave. Se debe procurar que los neonatos adquieran una buena inmunidad mediante buenas prácticas de manejo e higiene en el encalostrado, ya que está comprobado que los anticuerpos calostrales no protegen al 100% al ternero pero si ayudan a disminuir la sintomatología (Díaz *et al.*, 2014).

- El tamaño del rebaño: hay estudios que muestran una relación positiva entre el tamaño de la explotación y la infección por *Cryptosporidium* spp., debido al mayor hacinamiento de los animales y a una mayor presión de infección en el medio (Soilán, 2014); pero Castro-Hermida *et al.* (2002) señaló lo contrario, observando un mayor riesgo de infección en los rebaños de mayor tamaño, no encontrando diferencias significativas entre el régimen de granja (intensiva-extensiva) y el riesgo de infección.

- La especie de *Cryptosporidium* implicada: hasta el momento se han detectado 17 especies del protozoo en el ganado bovino, aunque muchas de ellas son sólo hallazgos ocasionales (Tabla 3.); las cuatro especies más comunes son *C. bovis*, *C. parvum*, *C. ryanae* y *C. andersoni* (Feng *et al.*, 2007). *C. parvum* es la especie más común en animales menores de 3 meses de edad y la más patógena, y por tanto la principal implicada en la aparición de brotes de diarrea en terneros (Fayer *et al.*, 2006, 2007; Santín *et al.*, 2008). Además su carácter zoonótico convierte a estos animales en el principal reservorio de la criptosporidiosis para el ser humano (Soilán, 2014). Otras especies frecuentes en ganado vacuno, como *C. bovis* o *C. ryanae*, están más adaptadas, y por tanto no son tan patógenas, produciendo una sintomatología leve o incluso inexistente, principalmente en bovinos adultos (Fayer *et al.*, 2008; Robertson *et al.*, 2014). *C. andersoni* afecta a las glándulas gástricas del abomaso produciendo gastritis y síndrome de maladigestión, y por tanto no se asocia a brotes de diarreas en vacuno (Robertson *et al.*, 2014).

**Tabla 3. Especies de *Cryptosporidium* que afectan al ganado vacuno, frecuencia de presentación y carácter zoonótico**

<b>Especie</b>	<b>Frecuencia</b>	<b>Carácter zoonótico</b>
<i>C. parvum</i>	Común	Si
<i>C. bovis</i>	Común	Si
<i>C. ryanae</i>	Común	No
<i>C. andersoni</i>	Común	Si
<i>C. suis</i>	Esporádica	Si
<i>C. hominis</i>	Esporádica	Si
<i>C. scrofarum</i>	Esporádica	No
<i>C. serpentis</i>	Esporádica	No
<i>C. felis</i>	Esporádica	Si
<i>C. canis</i>	Experimental	Si
<i>C. meleagridis</i>	Esporádica	Si
<i>C. wrairi</i>	Esporádica	No
<i>C. baileyi</i>	Esporádica	Si
<i>C. ubiquitum</i>	Esporádica	Si
<i>C. tyzzeri</i>	Esporádica	No
<i>C. suis-like</i>	Esporádica	¿?
<i>C. parvum-like</i>	Esporádica	¿?

*Signos clínicos*

Las infecciones por *C. parvum* se caracterizan por la eliminación de heces amarillo-blanquecinas de consistencia líquida o semipastosa y olor fétido; es frecuente que el animal presente también dolor abdominal y posturas antiálgidas, apatía, anorexia, pérdida de peso, retraso en el crecimiento y deshidratación, que pueden llegar a ser mortales (Robertson *et al.*, 2014).

### *Carácter zoonótico*

*Cryptosporidium* spp. es uno de los enteropatógenos zoonóticos más frecuentemente aislado en humanos, tanto de países desarrollados como en desarrollo (Fayer y Xiao, 2008). Los grupos con mayor riesgo de padecer la enfermedad son aquellos que presentan un sistema inmunitario más susceptible, como niños, ancianos y personas inmunocomprometidas (enfermos de cáncer o SIDA, etc.), sin olvidar aquellas personas que por su trabajo o hábitos de vida tengan un contacto estrecho y prolongado con animales (Fayer y Xiao, 2008). La principal vía de transmisión para las personas es la ingestión de ooquistes en agua de bebida, aunque también son comunes las infecciones por consumo de frutas y verduras lavadas con agua contaminada (Soilán, 2014). La gravedad de la infección varía según el estado inmunitario de cada individuo; así, en personas inmunocompetentes la infección puede llegar a ser asintomática, y en cualquier caso siempre autolimitante y de carácter leve. Por el contrario, en personas inmunocomprometidas la infección cursa de manera más grave, cronificándose y llegando a ser mortal (Fayer y Xiao, 2008).

Las dos especies responsables de la casi totalidad de los casos de criptosporidiosis humana son *C. hominis* y *C. parvum* (Fayer y Xiao, 2008; Robertson *et al.*, 2014). En Europa, y por tanto en nuestro país, *C. parvum* es más común; al ser la especie más frecuente en terneros menores de un mes, estos animales constituyen uno de los principales reservorios de la enfermedad para los seres humanos (Wang *et al.*, 2011).

### 1.2.2. *Giardia* spp.

*Giardia* spp. es un protozoo parásito flagelado que se incluye en el Phylum Metamonada, Subphylum Trichozoa, Superclase Eopharyngia, Clase Trepomonadea, Subclase Diplozoa, Orden Giardiida y Familia Giardiidae (Plutzer *et al.*, 2010). Actualmente se diferencian seis especies dentro del género *Giardia* que presentan una fuerte especificidad de hospedador; así, *G. ardeae* y *G. psittaci* parasitan aves, *G. agilis* anfibios, *G. muris* y *G. microti* roedores y *G. duodenalis* diferentes mamíferos, incluido el hombre (Plutzer *et al.*, 2010).

Este protozoo presenta un ciclo biológico directo, cuya principal vía de transmisión es la fecal-oral; así, los hospedadores se infectan tras ingerir los quistes (8-12  $\mu$ m), que constituyen sus formas de resistencia, a través del agua, la comida o el ambiente contaminado. En el duodeno, se liberan dos trofozoítos inmaduros, que morfológicamente presentan forma de media pera, con una depresión ventral en su cara interna que les permite fijarse a la mucosa intestinal; presentan también cuatro pares de flagelos que les confieren movilidad. Estos trofozoítos se multiplican asexualmente por fisión binaria y se fijan a la superficie de las células epiteliales intestinales,

principalmente del duodeno y yeyuno. Los trofozoítos dañan las microvellosidades intestinales y las atrofia, limitando la función de la barrera intestinal, lo que resulta en un aumento de la permeabilidad del epitelio así como en un síndrome de maladigestión y malabsorción (Geurden y Olson 2011; Thompson y Monis, 2012). Sin embargo, todavía se debe comprobar si el protozoo emplea los mismos mecanismos en el ser humano y en otros hospedadores; se sospecha que el síndrome de maladigestión-malabsorción pueda ser el resultado de una combinación de la acción de las toxinas liberadas por el parásito y la respuesta inflamatoria e inmunológica del hospedador (Thompson *et al.*, 2008).

Una parte de los trofozoítos son arrastrados mediante el peristaltismo intestinal hacia las regiones distales del intestino delgado, donde se enquistan. Estos quistes son extremadamente resistentes en el ambiente, y se eliminan con las heces. Los trofozoítos que alcanzan el medio sin haberse enquistado resultan poco viables, ya que están totalmente expuestos a las condiciones adversas del ambiente. La excreción de quistes infectantes se produce de manera intermitente (Xiao, 1994), lo que dificulta su detección, pues en el momento de la toma de muestras los animales infectados pueden no excretar quistes, dando lugar a falsos negativos. El período de prepatencia en ganado vacuno es muy variable, y oscila entre los 3 y los 21 días (Thompson *et al.*, 2008; Thompson y Monis, 2012).

### *Epidemiología*

*Giardia* spp. presenta una distribución cosmopolita. Tradicionalmente se consideraba un patógeno habitual del ser humano y de algunos animales de compañía, como el perro y el gato, pero recientemente se demostró su implicación en brotes de diarrea en ganado vacuno (Xiao, 1994).

En Europa las prevalencias oscilan entre el 7,2-39,1% en ganado vacuno, observándose un pico en la prevalencia en terneros de 61-90 días de edad (Huetink *et al.*, 2001; Mendonça *et al.*, 2007; Gillhuber *et al.*, 2014). Tanto en España como en Galicia los estudios realizados sobre la presencia de *Giardia* spp. en ganado vacuno son escasos. Las prevalencias señaladas son muy variables, pues dependen notablemente de la edad de los animales y de la presencia de diarrea; así se han descrito prevalencias muy bajas (0,2%) y moderadas (37,8%), como se indica en la Tabla 4.

Los quistes de este protozoo pueden mantenerse viables e infectantes en el ambiente hasta dos meses en condiciones de humedad y temperatura adecuadas (Thompson y Monis, 2012). Se ha observado que los quistes resisten a la potabilización y depuración del agua, así como a la acción de los desinfectantes más habituales en las dosis empleadas en las

explotaciones (García-Preledo, 2012). Por el contrario parecen presentar una cierta sensibilidad a la congelación (Plutzer *et al.*, 2010).

Hay distintos factores que influyen en el curso y presentación clínica de la enfermedad (Thompson y Monis, 2012), entre los que destacan la especie y genotipo del protozoo y el estado inmunitario del hospedador, muy relacionado con la nutrición, presencia de infecciones concomitantes y edad de los animales (Castro-Hermida *et al.*, 2007).

**Tabla 4. Prevalencia de infección por *Giardia duodenalis* en ganado vacuno en España**

Zona	Prevalencia	Autores
	26,6% <sup>a</sup>	(Castro-Hermida <i>et al.</i> , 2007)
Galicia	33,3% <sup>b</sup> (zona costera)	(Castro-Hermida <i>et al.</i> , 2011)
	37,8% <sup>b</sup> (zona interior)	
Aragón	11,7% <sup>b</sup>	(Quílez <i>et al.</i> , 1996)
País Vasco	1,76-5,29% <sup>b</sup>	(Cardona <i>et al.</i> , 2011)
Granada	0,2% <sup>a</sup>	(Díaz <i>et al.</i> , 1996)

<sup>a</sup> animales > 12 meses

<sup>b</sup> animales < 12 meses

#### *Signos clínicos*

La giardiosis puede cursar con signos clínicos o resultar asintomática; generalmente los animales adultos actúan como reservorios subclínicos para los más jóvenes y ayudan a perpetuar la infección en las explotaciones (Castro-Hermida *et al.*, 2007; Thompson *et al.*, 2008). En terneros está asociada con una diarrea crónica, que presenta una gran morbilidad pero escasa mortalidad (Bowman, 2009). El signo clínico más evidente es la presencia de heces más o menos formadas, de color claro y olor fétido, brillantes por la presencia de grasa y con mucosidad. Es característica la alternancia de períodos de diarrea con defecaciones normales. Además puede observarse deshidratación, apatía, pérdida de peso, anorexia, y retraso en el crecimiento.

#### *Carácter zoonótico*

*G. duodenalis* es el protozoo intestinal mas común relacionado con enteropatías en humanos, tanto en países subdesarrollados como desarrollados. A nivel mundial se diagnostican alrededor de 280 millones de casos anualmente (Cacciò y Sprong, 2001). Las principales vías de transmisión son la ingestión de agua o comida con quistes, la transmisión directa persona a



persona, el contacto con ambientes contaminados con quistes, y en menor medida, el contacto con animales (Thompson y Monis, 2012). Las dosis infectivas mínimas son bajas, de entorno a unos 10-100 quistes (Cacciò y Sprong, 2001).

Los grupos de riesgo, como en la mayoría de procesos gastrointestinales causados por protozoos, son niños, ancianos y personas con un sistema inmunitario deprimido, como personas positivas al virus de la inmunodeficiencia humana, malnutridas o en tratamientos quimioterapéuticos (Soilán, 2014).

Por su gran importancia para la salud humana, su genoma se ha estudiado ampliamente, lo que ha permitido detectar 7 genotipos diferentes (A-G) (Tabla 5.). Los genotipos responsables de la mayoría de casos de giardiasis en humanos son el A y el B, aislados también en ganado vacuno. Además, dentro del genotipo A, se han descrito tres subtipos: los subtipos A-I y A-II se consideran zoonóticos, mientras que el subtipo A-III, recientemente aislado en terneros lactantes, no parece estar relacionado con infecciones en personas (Feng y Xiao, 2011). En ganado vacuno, además de los genotipos A y B, se ha aislado el genotipo E, exclusivo de diferentes especies de animales domésticos.

**Tabla 5. Genotipos de *G. duodenalis*, principal hospedador y carácter zoonótico**

<b>Genotipo</b>	<b>Hospedador</b>	<b>Carácter zoonótico</b>
A	Hombre, primates, roedores, perro, gato, rumiantes domésticos, mamíferos silvestres	Si
B	Rumiantes domésticos, hombre, primates, équidos, perro	Si
C-D	Cánidos	Casos puntuales
E	Rumiantes domésticos, équidos, suidos	Casos puntuales
F	Gato	Casos puntuales
G	Roedores	No

Múltiples estudios han puesto de manifiesto que el genotipo más frecuente en ganado vacuno es el E: al no considerarse zoonótico, el ganado vacuno no parece constituir una de las principales fuentes de infección para el hombre (Berrilli *et al.*, 2004; Castro-Hermida *et al.*, 2007; Gillhuber *et al.*, 2014).

### 1.2.3. *Eimeria* spp.

Este protozoo se clasifica dentro del Phylum Apicomplexa, Clase Sporozoa, Familia Eimeriidae, Género *Eimeria*. Las especies de este género presentan una distribución mundial, con un elevado grado de especificidad de hospedador, que incluye mamíferos, aves, peces o reptiles (Dauguschies y Najdrowski, 2005). Está considerado un parásito intracelular obligado de ciclo biológico directo, con una fase endógena y otra exógena, necesaria para que los ooquistes resulten infectantes; en condiciones de humedad y temperatura adecuadas (18-27°C) los ooquistes esporulan en el medio.

Su principal vía de transmisión es la fecal-oral; cuando un hospedador adecuado ingiere los ooquistes esporulados, éstos se desenquistan en el tracto intestinal, liberándose los esporozoítos que invaden las células epiteliales intestinales. Tras varios ciclos de reproducción asexual o merogonia, el parásito comienza la fase de reproducción sexual o gametogonia. Durante estas fases de multiplicación, *Eimeria* spp. causa daños importantes en la mucosa intestinal, destruyendo gran parte de los enterocitos, produciendo enteritis a nivel de ciego, colon y partes distales del íleon. Los enterocitos destruidos serán reemplazados por otras células menos especializadas, lo que se traducirá en una menor capacidad para digerir y absorber entre otros, nutrientes, minerales y agua (Dauguschies y Najdrowski, 2005; Díaz *et al.*, 2014). La unión de los gametos femenino y masculino resultará en un cigoto, que tras recubrirse con una potente cubierta dará lugar al ooquiste, que saldrá con las heces.

Hasta el momento se han identificado en Europa 13 especies de *Eimeria* que afectan al ganado vacuno (Díaz *et al.*, 2014; Enemark *et al.*, 2015). Todas ellas pueden diferenciarse por la forma y el tamaño de sus ooquistes, que varía mucho; así se han observado ooquistes ovalados, en forma de huevo, redondeados, etc, y los tamaños van desde 49 µm de longitud las más grandes a 11 µm las más pequeñas. Es necesario señalar que no todas tienen una capacidad patógena suficiente para producir coccidiosis clínica. Tan solo cuatro de ellas tienen poder patógeno: *E. bovis*, *E. zuernii*, *E. ellipsoidalis* y *E. alabamensis*. *E. zuernii* y *E. bovis* están consideradas como especies altamente patógenas, provocando signos clínicos a dosis muy bajas, experimentalmente se observó que la dosis mínima para producir signos clínicos tras la exposición a *E. bovis* era tan solo de 50.000 ooquistes, y se comprobó que al duplicar esta cifra los signos se agravaban considerablemente (Dauguschies y Najdrowski, 2005). Por el contrario, *E. ellipsoidalis* y *E. alabamensis* son mucho menos patógenas, en el caso de la última son necesarias infecciones con 10-400 millones de ooquistes para que aparezcan signos clínicos

El periodo de prepatencia varía entre las diferentes especies de *Eimeria*. Así *E. bovis*, *E. zuernii* y *E. auburnensis* tienen periodos de prepatencia de hasta 17 días; por el contrario *E.*

*ellipsoidalis* presenta periodos más cortos, de entre 8-10 días (Faber *et al.*, 2002) y *E. alabamensis* entre 6-10 días (von Samson-Himmelstjerna *et al.*, 2006).

### *Epidemiología*

Las coccidiosis provocadas por *Eimeria* están ampliamente extendidas en las explotaciones de ganado vacuno, observándose tasas de morbilidad muy elevadas. Esto puede deberse a que los ooquistes son muy resistentes, rodeados por una gruesa cubierta que les protege de las condiciones adversas del medio; pueden resistir temperaturas de hasta -8°C y sobrevivir más de un año a 4°C y en condiciones óptimas hasta 8 meses en el heno, aunque son muy sensibles al calor y a la sequía (Díaz *et al.*, 2014; Dauschies y Najdrowski, 2005). En Galicia se ha observado que las coccidiosis son muy prevalentes en bovinos, encontrándose cifras de entre el 76 y el 81%. En cuanto a las prevalencias individuales encontradas fueron moderadas-altas, oscilando entre el 18% y el 56% (Díaz *et al.*, 2013). En Europa la morbilidad que presenta este parásito es alta, las prevalencias de infección a nivel de explotación oscilan entorno al 78-100% (Klockiewicz *et al.*, 2007; Lassen *et al.*, 2009; Koutny *et al.*, 2012; Enemark *et al.*, 2013; Forslid *et al.*, 2015), mientras que las prevalencias observadas a nivel individual oscilan entre 7-83,67% (Klockiewicz *et al.*, 2007; Stewart *et al.*, 2008; Lassen *et al.*, 2009; Bangoura *et al.*, 2011; Koutny *et al.*, 2012; Enemark *et al.*, 2013; Forslid *et al.*, 2015).

Las infecciones en la mayoría de los casos son producidas por varias especies, siendo las más comunes las de 5-6 especies; por el contrario, las monoinfecciones son muy escasas (Enemark *et al.*, 2013). *Eimeria* spp. parasita bovinos a partir de las 2 semanas de vida hasta adultos, siendo los animales de entre 3 semanas y 6 meses más susceptibles de padecer coccidiosis clínica.

Una de las características de este parásito es que los animales que superan la enfermedad desarrollan una cierta inmunidad protectora, que no les deja exentos de volver a padecer coccidiosis, pero les ayuda a disminuir la cantidad de ooquistes presentes en el tracto intestinal (Díaz *et al.*, 2014). Estos animales que adquieren la inmunidad van a excretar una pequeña cantidad de ooquistes a lo largo de su vida, perpetuando las reinfecciones en los rebaños y generando lo que se conoce como estabilidad endémica.

Hay varios factores que predisponen a un animal a padecer coccidiosis, destacando el estado inmunitario y nutricional del animal, la presencia de infecciones concomitantes y situaciones estresantes, como el transporte, el cambio de dieta, condiciones ambientales adversas, etc. Otros factores suponen un mayor riesgo de infección, como las condiciones ambientales, temperaturas moderadas-elevadas y humedad alta o precipitaciones abundantes parecen estar íntimamente relacionadas con una mayor excreción de ooquistes por gramo (opg) (Matjila y Penzhorn, 2002). Además, en granjas intensivas, donde es frecuente el hacinamiento

y la aplicación de medidas higiénico-sanitarias no adecuadas, la presión de infección aumenta considerablemente (Dauguschies y Najdrowski, 2005).

Con respecto a las infecciones por *Eimeria* spp. hay que tener en cuenta que no todos los animales que eliminan ooquistes en heces se consideran con coccidiosis; para ello tienen que darse una serie de características, como una presión de infección elevada, presencia de signos clínicos, que los animales no hayan desarrollado todavía una inmunidad protectora y que las especies implicadas tengan carácter patógeno; hay estudios en los que se observaron especies patógenas en animales que no presentaban signos clínicos (Fayer *et al.*, 2000), por tanto, por si solo, este requisito no producirá coccidiosis.

#### *Signos clínicos*

Las infecciones por coccidios del género *Eimeria* son autolimitantes y generalmente los signos desaparecen cuando cesa la excreción de ooquistes. La coccidiosis subclínica se presenta cuando el animal se infecta con especies poco patógenas, o cuando ingiere dosis bajas de especies con elevada patogenicidad, como *E. zuernii* y *E. bovis*; estos procesos pueden ser asintomáticos o caracterizarse por una diarrea leve/moderada.

*E. zuernii* y *E. bovis* son las especies responsables de provocar coccidiosis aguda, caracterizada por la presencia de diarrea hemorrágica profusa, junto con fiebre, dolor abdominal, tenesmo, deshidratación, anorexia, pérdida de peso, y a veces anemia; se han descrito la aparición de signos nerviosos en infecciones por *E. zuernii* (Bowman, 2009). Los terneros que sobreviven a una coccidiosis aguda son más susceptibles a padecer otros procesos, y la recuperación puede, en ocasiones, no llegar a ser completa. *E. alabamensis*, al presentar menor capacidad patógena, provoca una diarrea acuosa sin sangre, deshidratación, debilidad, y pérdida de peso; las tasas de mortalidad son menores y raras en monoinfecciones.

#### *Carácter zoonótico*

Debido a que todas las especies de *Eimeria* presentan una elevada especificidad de hospedador, este parásito no se considera zoonótico y por tanto no representa ningún peligro para la Salud Pública. Aún así, los daños que ocasiona y la consecuente inmunodepresión que genera, predispone a los animales a otras infecciones, pudiendo tener éstas potencial zoonótico.

## 2. Objetivos

1. Determinar la prevalencia de *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp., y *Eimeria* spp. en terneros menores de un mes de edad con diarrea.
2. Identificar las distintas especies de *Eimeria* implicadas en terneros lactantes con diarrea neonatal.
3. Estudiar la posible relación entre la prevalencia de infección y varios factores intrínsecos como la edad de los animales y la consistencia de las heces.
4. Comparar la sensibilidad entre la tinción negativa de Heine y la inmunofluorescencia directa para la detección de ooquistes de *Cryptosporidium* spp.

## 3. Materiales y métodos

En este apartado se señala el número y procedencia de las muestras recogidas, así como las técnicas utilizadas para la identificación de las diferentes formas parasitarias y las técnicas estadísticas empleadas.

### 3.1. Toma de muestras

Se recogieron un total de 84 muestras de heces de terneros menores de un mes de edad, procedentes de 48 explotaciones ubicadas en distintos ayuntamientos de la provincia de Lugo (A Fonsagrada, Castroverde, Chantada, Guntín, Monterroso, O Corgo, Ribadeo, Taboada), A Coruña (Cesuras, Mazaricos) y Pontevedra (Rodeiro). Todos los animales incluidos en el estudio eliminaban heces no formadas, que se clasificaron, dependiendo de su consistencia, en pastosas o líquidas. Las heces se recogieron directamente del recto y se transportaron al laboratorio en botes de plástico estéril con tapa de rosca, conservándose a 4°C hasta su procesamiento.

### 3.2. Técnicas empleadas

Los objetivos del presente estudio incluyen la detección de los enteropatógenos de etiología parasitaria implicados en los procesos diarreicos de los terneros neonatos, donde se incluyen principalmente *Cryptosporidium* spp., coccidios del género *Eimeria* y *Giardia* spp. Debido a

que no existe una técnica que permita la identificación de todos estos parásitos y que presente elevados valores de sensibilidad y especificidad, se llevaron a cabo diferentes métodos orientados a la detección de cada patógeno. Así, para la detección de ooquistes de coccidios eiméricos se empleó la técnica de flotación, que también permite identificar otros patógenos menos frecuentes, como *Toxocara vitulorum*. La presencia de quistes de *Giardia* spp. se determinó mediante un test comercial de inmunofluorescencia directa (IFAT), mientras que la detección de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. se realizó con dos técnicas: la tinción negativa de Heine y la IFAT, que presenta una sensibilidad mucho mayor que la primera.

### 3.2.1. Tinción negativa de Heine

Esta técnica, descrita por Heine en 1982, es muy empleada para la visualización de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. por su sencillez, rapidez y bajo coste. Para su realización se necesita fucsina básica fenicada, un colorante que teñirá los detritus fecales de rosa sobre los que resaltarán los ooquistes sin teñir, observándose como formas redondeadas de entre 3-6 µm refringentes con una sombra oscura central correspondiente a su cuerpo residual. Un inconveniente de esta técnica es que no es permanente, ya que pasados unos 15 minutos la preparación se deteriora, los ooquistes se secan y se vuelven menos visibles, lo que puede dar lugar a falsos negativos (Potters y Esbroeck, 2010).

Para la realización de la técnica se deposita una pequeña gota de heces en un portaobjetos y una cantidad similar de fucsina, se mezclan y se realiza una extensión muy fina, para que la mezcla seque rápido, evitando así que la fucsina tiña los ooquistes; una vez seca se observa al microscopio con aceite de inmersión con el objetivo de 100x. Se contabilizaron todos los ooquistes observados en 20 campos elegidos al azar para realizar una estimación semicuantitativa de la intensidad de eliminación de ooquistes de este protozoo; el recuento medio se expresó en ooquistes por campo (opc).

### 3.2.2. Técnica de flotación

La técnica de flotación es un método que permite concentrar quistes y ooquistes de protozoos, así como huevos de algunos helmintos. Estas formas parasitarias tienen menor densidad que los detritus fecales, por lo que al añadir a la muestra una solución de flotación, se desplazan hacia la parte superior del tubo, concentrándose y separándose de los restos fecales. En este trabajo se empleó la técnica modificada de McMaster, que permite, además, realizar un análisis cuantitativo del número de ooquistes.

Para la realización de la técnica se pesaron 3 gramos de heces y se le añadieron 42 ml de agua; tras homogeneizar bien la muestra fecal, se filtró por una malla de 150 µm de diámetro de poro, con el objetivo de eliminar los restos de heces más groseros. El líquido filtrado se

recogió en tubos, que se centrifugaron a 380 x g durante 10 minutos. Posteriormente se desechó el sobrenadante, se desprendió el sedimento y se le añadió solución salina saturada (densidad=1,19); tras homogeneizar bien el sedimento con la solución de flotación con la ayuda de una pipeta, se llenaron las dos celdillas de la cámara de McMaster para proceder al recuento mediante visualización al microscopio con el objetivo de 100 aumentos. Una vez realizado el recuento de los ooquistes, se empleó la fórmula que se muestra la Figura 1 para obtener los ooquistes por gramo de heces (opg).

$$\text{Ooquistes por gramo de heces (opg)} = \left( \frac{(n^{\circ} \text{ ooquistes observados}) \times 45 \text{ ml}}{0,30 \text{ ml}} \right) / 3 \text{ g}$$

**Figura 1. Ecuación mediante la cual se obtienen los OPG de la muestra estudiada**

### 3.2.3. Identificación específica de ooquistes de *Eimeria* spp.

Todas aquellas muestras que resultaron positivas a coccidios eiméridos mediante flotación, se seleccionaron para su posterior identificación específica de forma individual. Para ello, es necesario realizar un estudio morfológico de los ooquistes esporulados, que se llevó a cabo siguiendo la técnica descrita por Hendrix en 1999; las heces se depositaron en una placa de Petri y posteriormente se añadió una solución de dicromato potásico al 2,5%. La mezcla se incubó a 20°C durante al menos 5 días, ya que en este periodo todas las especies de *Eimeria* que afectan al ganado vacuno suelen haber completado su esporulación; la mezcla se homogeneizó diariamente con una pipeta pasteur, con el objetivo de oxigenarla y permitir así la esporulación de los ooquistes. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, la muestra se introdujo en tubos de 12 ml y se centrifugó a 380 x g durante 5 minutos. Tras eliminar el sobrenadante, el sedimento se homogeneizó con solución de sacarosa de Sheather (densidad=1,27); el tubo se rellenó hasta formar un menisco en la parte superior del mismo, se colocó un cubreobjetos y se centrifugó de nuevo a 380 x g durante 5 minutos. Por último, el cubreobjetos se depositó en un portaobjetos y los ooquistes se observaron al microscopio a 400 aumentos.

Para identificar las especies de *Eimeria* se tuvieron en cuenta una serie de características de los ooquistes, como su tamaño, color, o presencia de diferentes estructuras, descritos en la Tabla 6. Para realizar el análisis morfológico de los ooquistes es necesario un ocular micrométrico, que permite medir su longitud y su anchura. En este trabajo se identificaron al menos 100 ooquistes por muestra.

Tabla 6. Características morfológicas de los ooquistes al considerar la especie de *Eimeria*

Especie	Forma	Tamaño medio (µm)	Micrópilo	Gránulo polar y/o residuos del ooquiste
<i>E. alabamensis</i>	Ovoide	19x13	No	No
<i>E. auburnensis</i>	Elongado u ovoide	38x23	Si	Si (residuos no)
<i>E. bovis</i>	Ovoide o subesférica	28x20	Si	No
<i>E. brasiliensis</i>	Elipsoidal	37x27	Si	Si (residuos no)
<i>E. bukidnonensis</i>	Ovoide o con forma de pera	49x35	Si	Si (residuos no)
<i>E. canadensis</i>	Ovoide o elipsoidal	33x23	Variable	Si
<i>E. cylindrica</i>	Cilíndrico o elongada	23x12	No	No
<i>E. ellipsoidal</i>	Elipsoidal u ovoide	23x16	No	No
<i>Eimeria pellita</i>	Forma de huevo	40x28	Si	Si (residuos no)
<i>E. subspherica</i>	Resdondeada o subesférica	11x10	No	No
<i>E. wyomingensis</i>	Ovoide	40x28	Si	No
<i>E. zuernii</i>	Subesférica	18x16	No	No

### 3.2.4. Inmunofluorescencia directa (IFAT)

En el presente estudio se realizó la técnica de la IFAT para la identificación de quistes de *Giardia* spp. y como test de referencia o Gold Standard para el recuento de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. Las técnicas inmunológicas presentan una alta sensibilidad y especificidad, con valores muy superiores a los descritos en otras técnicas basadas en la observación de muestras teñidas. La inmunofluorescencia se basa en una reacción antígeno-anticuerpo; en este caso el anticuerpo, que se unirá con antígenos de superficie de la pared de la



forma parasitaria, está marcado con un fluorocromo, que emitirá luz fluorescente al ser estimulado con luz ultravioleta. En la actualidad existe una gran variedad de kits comerciales que emplean anticuerpos monoclonales específicos frente a determinados patógenos para evitar reacciones cruzadas.

En este trabajo se empleó un kit comercial (Aqua -Glo™ G/C, Waterborne Inc., EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit contiene anticuerpos anti-*Giardia* y anti-*Cryptosporidium*, por lo que permite detectar quistes y ooquistes de ambos parásitos en la misma muestra. Una vez realizada la técnica, la muestra se tiene que observar con un microscopio de fluorescencia; los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. se observan como formas redondeadas de aproximadamente 5 µm de color verde manzana intenso con una zona más oscura en su parte central, mientras que los quistes de *Giardia* spp. son ovalados y de mayor tamaño (aproximadamente 10 µm), también de color verde intenso.

Antes de realizar la IFAT, y con objeto de incrementar aún más la sensibilidad de la técnica, se realizó una concentración de las formas parasitarias empleando una técnica de sedimentación difásica con agua destilada y acetato de etilo. Se pesaron 2 gramos de heces en una báscula de precisión, que se homogeneizaron con 20 ml de agua destilada. La mezcla se filtró por una malla de 50 µm de diámetro de poro, y con el filtrado se llenó un tubo de 15 ml, que se centrifugó a 380 x g durante 5 minutos. Posteriormente se eliminó el sobrenadante y el sedimento se homogeneizó con 8 ml de agua destilada y 2 ml de acetato de etilo mediante vórtex. La muestra se centrifugó de nuevo a 380 x g durante 5 minutos, apareciendo cuatro fases: el sedimento en la parte inferior, una capa con restos solubles en agua, una capa de grasa más o menos espesa dependiendo de la muestra, y en la parte superior restos solubles en acetato de etilo. Tras eliminar las tres capas superiores, el sedimento, que contiene las formas parasitarias, se homogenizó bien con 1 ml de agua destilada y se pipeteó a un tubo eppendorf de 2 ml, que se rotuló con lápiz y bolígrafo. Las muestras se conservaron a 4°C hasta su utilización.

Para realizar la técnica IFAT, primeramente las muestras se redujeron a un volumen de 250 µl y se pipetearon 10 µl en un portaobjetos; con un rotulador de silicona se realizó un círculo alrededor de la gota a modo de barrera, permitiendo utilizar un menor volumen de anticuerpo. Una vez seca la muestra, se fijó con 45 µl de metanol y se dejaron secar al aire. Posteriormente se pipetearon 45 µl del reactivo que contiene el anticuerpo marcado con el fluorocromo; es importante extender el anticuerpo con cuidado, y que cubra toda la superficie de la muestra. Por otro lado se prepararon unas cámaras húmedas con placas de Petri, forrándolas con papel humedecido, para evitar la desecación completa de las muestras una vez introducidas en la estufa. Las muestras se depositaron en una estufa a 37°C durante 30-35 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se lavaron con unos 50-100 µl de solución tampón

(SureRinse™) para arrastrar el exceso de anticuerpo y se secaron al aire, dejando el portaobjetos inclinado sobre un papel absorbente para que el exceso de solución tampón escurriera por el portaobjetos. Por último, se depositaron unos 45 µl de medio de montaje (No-Fade™), se cubrió con un cubreobjetos y se protegió de la luz hasta el momento de su examen microscópico con un microscopio de fluorescencia empleando 200 aumentos.

La estimación del número de ooquistes/quistes que se hizo mediante esta técnica fue semicuantitativa, las muestras se agruparon en 4 grupos en función del número de formas parasitarias de resistencia observadas, tal y como se muestra en la Tabla 7.

**Tabla 7. Estimación semicuantitativa de la eliminación de ooquistes/quistes de *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp. en heces de terneros, mediante IFAT**

Nº ooquistes/quistes observados	Intensidad de eliminación
1-10	+
11-50	++
50-150	+++
>150	++++

### 3.3. Análisis de los factores de riesgo

En el análisis de los posibles factores de riesgo asociados a la presencia de terneros infectados por parásitos causantes de diarrea neonatal se empleó la positividad individual de los animales como variable dependiente. Las variables independientes empleadas fueron la edad de los animales, en semanas, y la consistencia de las heces, que se clasificaron como líquidas o pastosas.

Los datos obtenidos en este estudio se procesaron con ayuda de la hoja de cálculo Microsoft Excel 2007 y su análisis estadístico se realizó mediante el paquete estadístico IBM SPSS Statistics para Windows, versión 22.0 (IBM Corporation, Armonk, EE.UU.). En el estudio de la intensidad de eliminación de formas parasitarias en las heces se calculó la media ( $\bar{X}$ ), como indicador de tendencia central, la desviación típica (D.E.), y los valores máximo (máx.) y mínimo (mín.) como medidas de dispersión. Para comprobar la existencia de diferencias estadísticamente significativas respecto al porcentaje de infección al tener en cuenta los diferentes parámetros considerados se empleó el test Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ). Se utilizó la prueba Kruskal-Wallis, tomando las aproximaciones a la  $\chi^2$  que hace el programa, para comparar todos los grupos entre sí, y cuando estos se compararon de 2 en 2 se empleó la prueba “U” de Mann-Whitney. Se consideraron significativos los valores iguales o menores a 0,05 ( $p \leq 0,05$ ).

En el caso de *Cryptosporidium* spp. se empleó el estadístico kappa ( $\kappa$ ) para medir la concordancia entre los resultados obtenidos con las diferentes pruebas analíticas (tinción negativa de Heine e IFAT). Valores de  $\kappa$  cercanos a 1 suponen un mayor grado de acuerdo entre los resultados de las técnicas. Para la valoración de la concordancia se empleó la escala propuesta por Landis y Koch (1977) (Tabla 8.).

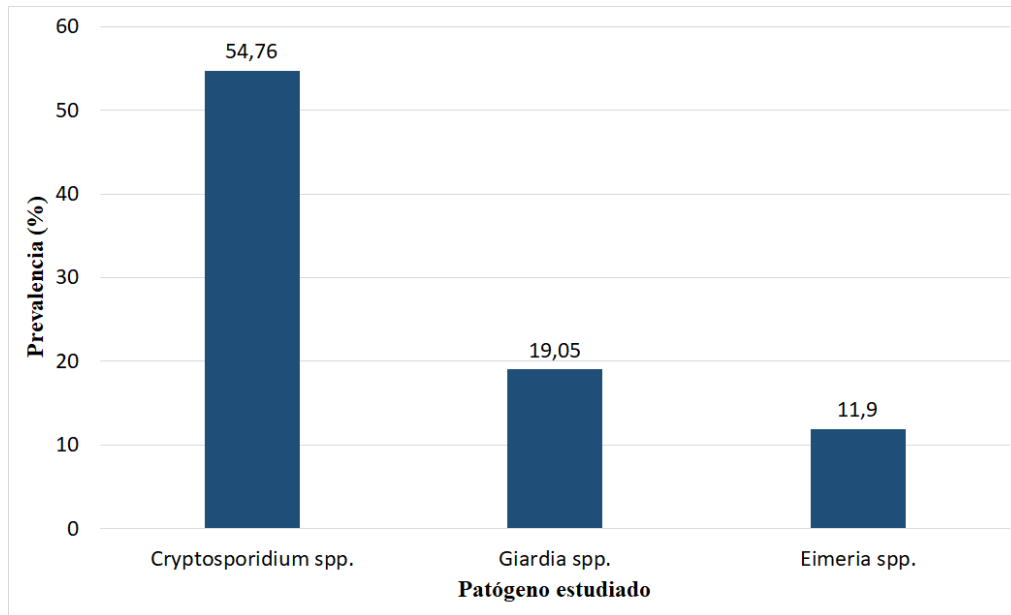
**Tabla 8. Valoración del grado de acuerdo entre dos técnicas en función del valor de Kappa**

<b>Kappa</b>	<b>Grado de acuerdo</b>
<0	Sin acuerdo
0-0,2	Insignificante
0,2-0,4	Bajo
0,4-0,6	Moderado
0,6-0,8	Bueno
0,8-1	Muy bueno

## 4. Resultados y discusión

### 4.1. Prevalencias e intensidad de eliminación

Los resultados obtenidos muestran que 54 de los 84 animales estudiados (64,3%) eliminaron formas parasitarias en las heces, identificándose tres géneros diferentes: *Cryptosporidium*, *Giardia* y *Eimeria*. El patógeno que presentó una mayor prevalencia fue *Cryptosporidium* spp., pues de los 84 animales estudiados, 46 resultaron positivos; en menor proporción se encontraron quistes de *Giardia* spp. (16/84), y ooquistes de *Eimeria* spp. (10/84) (Figura 2).



**Figura 2.** Prevalencia de infección (%) por *Cryptosporidium* spp, *Giardia* spp y *Eimeria* spp en terneros con diarrea en Galicia

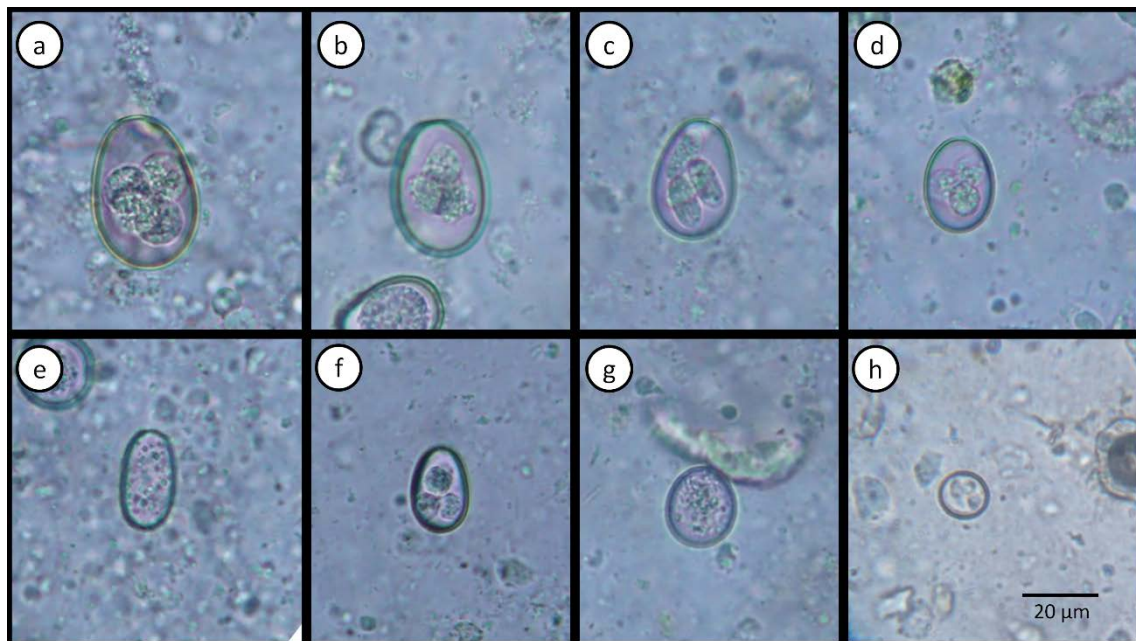
Los elevados porcentajes de infección por *Cryptosporidium* spp. en terneros menores de un mes concuerda con lo descrito por otros autores. Así, en España se encontraron prevalencias similares, entre el 52,3-57,8% (Quílez *et al.*, 1996, 2008; de la Fuente *et al.*, 1998, 1999; Soilán, 2014). Sin embargo García-Meniño *et al.*, en dos estudios realizados en los años 2013 y 2014 encontraron prevalencias mucho mayores, del 76% y 70%, respectivamente, aunque estos resultados podrían deberse al reducido número de muestras analizadas.

La prevalencia de infección por *Giardia* spp. fue moderada, pero debido al tipo de muestreo realizado y a la eliminación intermitente de quistes que presenta este parásito, el porcentaje real de animales positivos a *Giardia* spp. está subestimado; para hacer una estimación más objetiva, deberían realizarse varios muestreos consecutivos en un mismo animal. Sin embargo, los resultados observados fueron ligeramente superiores a los observados por Quílez *et al.* (1996), que señalaron una prevalencia del 14,1% en terneros menores de 45 días. Las prevalencias encontradas en otros estudios llevados a cabo en nuestro país son mucho más reducidas, pero no pueden compararse con los resultados de este trabajo ya que proceden de animales adultos, con o sin diarrea (Díaz *et al.*, 1996; Cardona *et al.*, 2011). En otros países europeos se han descrito prevalencias similares; así en terneros con diarrea en Portugal se observó un porcentaje del 14,1% (Mendonça *et al.*, 2007), mientras que en Alemania se registraron prevalencias del 24% (Maddox-Hyttel *et al.*, 2006).

La prevalencia de infección por *Eimeria* spp., fue la más baja. Estos bajos porcentajes se explican si se tiene en cuenta que solo se muestrearon animales menores de un mes, y que es entre los 20 y 60 días de edad donde se observan tasas de infección más elevadas (Gillhuber *et*

*al.*, 2014). Por ello, las investigaciones que incluyen animales más mayores muestran prevalencias de infección mucho más elevadas, entre el 37% y el 67,1% (Faber *et al.*, 2002; Enemark *et al.*, 2013; Forslid *et al.*, 2015).

Tras el análisis morfométrico de los ooquistes de *Eimeria* spp. se identificaron 9 especies de este protozoo: *E. alabamensis*, *E. auburnensis*, *E. bovis*, *E. canadensis*, *E. cylindrica*, *E. ellipsoidalis*, *E. subspherica*, *E. wyomingensis* y *E. zuernii*; todas, a excepción de *E. auburnensis*, se muestran en la Figura 3. La longitud y la anchura media, mínima y máxima de las especies encontradas se resume en la Tabla 9.



**Figura 3.** Especies de *Eimeria* identificadas en las muestras estudiadas. a) *E. wyomingensis*; b) *E. canadensis*; c) *E. bovis*; d) *E. ellipsoidalis*; e) *E. cylindrica*; f) *E. alabamensis*; g) *E. zuernii*; h) *E. subspherica*

Las especies más comunes fueron *E. ellipsoidalis* (35,66%), *E. bovis* (33,65%), *E. zuernii* (13,15%) y *E. auburnensis* (11,76%) seguidas en menor proporción por *E. cylindrica* (2,88%), *E. subspherica* (1,87%), *E. alabamensis* (1,22%), *E. canadensis* (0,34%) y *E. wyomingensis* (0,23%). En Europa las especies más implicadas varían de un estudio a otro, pero si es cierto que *E. bovis* y *E. zuernii* presentan prevalencias elevadas que oscilan entre 23-81,8% (Klockiewicz *et al.*, 2007; Stewart *et al.*, 2008; Lassen *et al.*, 2009). *E. ellipsoidalis* es también muy frecuente, con prevalencias en torno al 8,7-54,1% (Koutny *et al.*, 2012; Forslid *et al.*, 2015). Sin embargo, von Samson-Himmelstjerna *et al.* (2006) observaron que *E. alabamensis* era la especie más prevalente (83,3%).

**Tabla 9. Medidas (longitud y anchura) de cada especie de *Eimeria* identificada**

Especie	Longitud (µm)			Anchura (µm)		
	Media	Mínima	Máxima	Media	Mínima	Máxima
<i>E. alabamensis</i>	19,08	16,25	22,5	12,75	11,25	15
<i>E. auburnensis</i>	37,37	35	40	23,51	17,5	27,5
<i>E. bovis</i>	28,55	25	32,5	19,92	16,5	23,5
<i>E. canadensis</i>	32,92	31,25	35	21,25	20	22,5
<i>E. cylindrica</i>	28,85	21	25	13,15	12,5	14
<i>E. ellipsoidalis</i>	23,38	20	26	16,15	13	23,75
<i>E. subspherica</i>	10,92	10	12	10,5	9	11,5
<i>E. wyomingensis</i>	41,67	40	42,5	27,5	27,5	27,5
<i>E. zuernii</i>	18,46	15	22,5	15,74	13,5	18,75

Todas las muestras presentaron infecciones mixtas de entre 2-6 especies, siendo 5 el número de especies encontradas más frecuente, como se muestra en la Tabla 10. La presencia de infecciones mixtas concuerda con los resultados encontrados en la mayoría de estudios (Klockiewicz *et al.*, 2007; Stewart *et al.*, 2008; Lassen *et al.*, 2009; Koutny L. *et al.*, 2012; Enemark *et al.*, 2013; Forslid *et al.*, 2015).

**Tabla 10. Casos (%) según el número de especies de *Eimeria* hallados**

Número de especies de <i>Eimeria</i>	Casos (%)
1	0
2	11,11
3	11,11
4	22,23
5	44,44
6	11,11
7	0
8	0
9	0

Además se estimó la intensidad de eliminación para cada uno de los patógenos, como se muestra en la Tabla 11. La tasa de eliminación media para *Cryptosporidium* spp. coincide, en líneas generales, con las observadas por Castro-Hermida *et al.* (2011).

**Tabla 11. Intensidad de eliminación de los patógenos estudiados**

Patógeno estudiado	Eliminación media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
<i>Cryptosporidium</i> spp.	1,90 opc <sup>a</sup> 3,021 <sup>b</sup>	2,43 <sup>a</sup> 1,13 <sup>b</sup>	0,05 opc <sup>a</sup>	10,40 opc <sup>a</sup>
<i>Giardia</i> spp.	2,125	1,02		
<i>Eimeria</i> spp.	5.885,8 opg	8.006,66 opg	50 opg	21.100 opg

<sup>a</sup> resultados obtenidos a partir de la técnica de tinción negativa de Heine

<sup>b</sup> resultados obtenidos a partir de la técnica de la IFAT

La eliminación media de ooquistes fue más elevada que la encontrada por algunos autores. Koutney *et al.* (2012), observaron que el 75% de animales que eliminaban ooquistes de *Eimeria* lo hacían a unas dosis bajas de  $\leq 1.000$  opg. Teniendo en cuenta las especies de *Eimeria* presentes en los animales, Klockiewicz *et al.* (2007) observaron que la mayoría de animales que excretaban ooquistes de *E. bovis* y *E. zuernii* presentaban una intensidad de eliminación baja (100-1.000 opg), mientras que las tasas más altas de eliminación se observaron en el caso de *E. alabamensis* y *E. ellipsoidalis* (2.610 opg y 1.785 opg).

Cabe destacar que también se observó que 30 animales (35,7%) no eliminaron enteropatógenos de etiología parasitaria; debido a que no se analizó la presencia de otros agentes patógenos, víricos o bacterianos, la eliminación de heces no formadas podría responder a la acción de diversos agentes infecciosos o incluso podrían ser diarreas de origen alimentario.

#### 4.2. Asociaciones entre los distintos patógenos

Debido a que la intensidad de los signos clínicos puede deberse a la acción conjunta o sinérgica de varios enteropatógenos, se estudió la posible presencia de varios parásitos en un mismo animal. Como se muestra en la Tabla 12, las infecciones simples fueron las más prevalentes, hallándose en 39 de los 54 animales; en este tipo de muestras, el parásito más frecuente fue *Cryptosporidium* spp. Las asociaciones dobles se detectaron en 12 animales, siendo predominantes las integradas por *Cryptosporidium* spp y *Giardia* spp. Por último, las asociaciones triples fueron las menos frecuentes, ya que solo 3 terneros excretaron quistes/ooquistes de los 3 protozoos en sus heces.

Tabla 12. Asociaciones encontradas en los animales estudiados y su prevalencia (%)

Tipo de asociación		Prevalencia (%)
<b>Simple</b>		<b>72,22%</b>
	<i>Cryptosporidium</i> spp.	87,18%
	<i>Giardia</i> spp.	7,69%
	<i>Eimeria</i> spp.	5,13%
<b>Doble</b>		<b>22,22%</b>
	<i>Cryptosporidium</i> spp. + <i>Giardia</i> spp.	58,33%
	<i>Giardia</i> spp. + <i>Eimeria</i> spp.	25%
	<i>Cryptosporidium</i> spp. + <i>Eimeria</i> spp.	16,67%
<b>Triple</b>		<b>5,56%</b>
	<i>Cryptosporidium</i> spp. + <i>Giardia</i> spp. + <i>Eimeria</i> spp.	100%

Quílez *et al.* (1996), observaron un menor porcentaje de patógenos en asociación. A pesar de ello, coinciden con este estudio en que *Cryptosporidium* spp. fue el agente más frecuente en monoinfecciones, y que tanto *Giardia* spp. como *Eimeria* spp. presentaron una mayor prevalencia en sinergia con otro patógeno; en el caso de *Giardia* spp. la mayor prevalencia encontrada fue junto con *Cryptosporidium* spp., resultado que se explica teniendo en cuenta la edad de los animales. En un estudio realizado con animales más mayores (< 12 meses) la asociación más común resultó la de *Giardia* spp. con *Eimeria* spp. (Gillhuber *et al.*, 2014).

Los resultados observados para *Giardia* spp., que son más frecuentes en combinación con otros patógenos, sugieren que la eliminación de un elevado número de quistes, detectables mediante estas técnicas, depende de la presencia conjunta de otro enteropatógeno. Esto podría estar relacionado con el estado inmunitario del animal, de modo que este protozoo necesitaría de la existencia de otro agente que produzca una cierta inmunosupresión en el hospedador para poder multiplicarse.

Los reducidos porcentajes de la asociación entre *Cryptosporidium* spp. y *Eimeria* spp. puede deberse a un diferente patrón de distribución de la prevalencia al considerar la edad; el porcentaje de infección por *Eimeria* spp. aumenta considerablemente a partir del día 20 de edad, mientras que el de *Cryptosporidium* spp. presenta un pico a los 14 días de edad para disminuir paulatinamente hasta llegar a prevalencias muy bajas entorno al día 30 (Gillhuber *et al.*, 2014).

#### 4.3. Factores estudiados

En este estudio se analizó la posible asociación de algunas variables intrínsecas (edad y consistencia de las heces) con la presencia e intensidad de eliminación de los protozoos identificados. La existencia de asociaciones estadísticamente significativas entre las variables



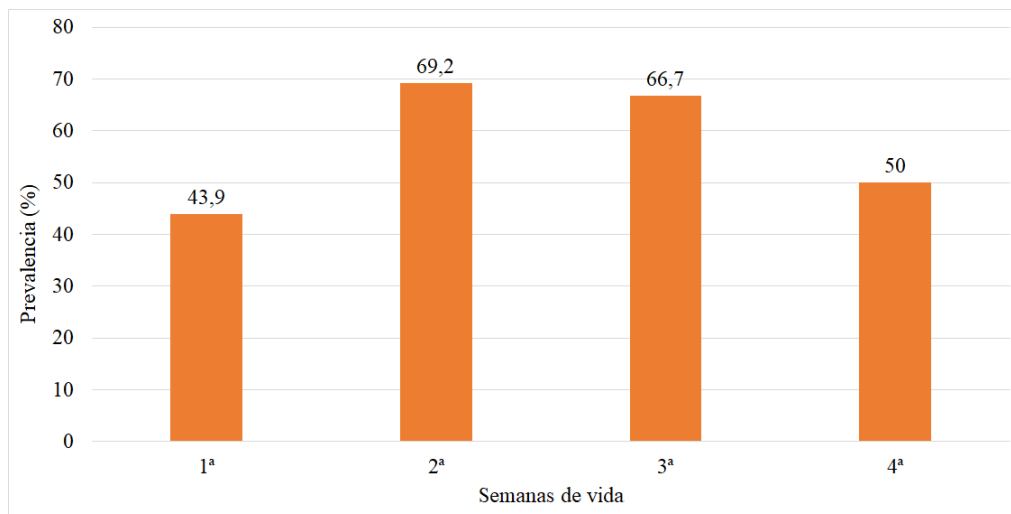
podría resultar orientativo para realizar un primer diagnóstico de campo, permitiendo asociar ciertos patógenos parasitarios con la edad y la consistencia de las heces de los animales.

#### 4.3.1. Edad de los animales

Se analizó la posible influencia de la edad sobre la prevalencia y la intensidad de eliminación de quistes/ooquistes de los tres géneros de protozoos detectados en el presente estudio. Para ello se dividieron los animales en cuatro grupos considerando las semanas de vida, quedando un total de 41, 13, 6 y 10 animales respectivamente en cada uno.

##### *Cryptosporidium* spp.

Como se observa en la Figura 4, los porcentajes de infección por *Cryptosporidium* spp fueron elevados y siempre superiores al 40% en todos los rangos de edad estudiados, aunque las más reducidas se observaron en los animales de menos de una semana de vida. Posteriormente, los porcentajes se incrementaron, observándose el pico de prevalencia en la segunda y tercera semanas de vida. Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $\chi^2=3,145$ ;  $p=0,370$ ).



**Figura 4.** Prevalencias de *Cryptosporidium* spp. al considerar las semanas de vida de los terneros

Estos resultados son similares a los encontrados en diferentes estudios, en los que también se observaron las prevalencias más altas en la segunda y tercera semanas de vida. Quílez *et al.* (1996) también apreció las mayores prevalencias en animales de 6-15 días de edad (76,7%). La menor prevalencia observada en la cuarta semana de vida coincide con lo observado en otros estudios, y confirma que a medida que los animales crecen y son expuestos a continuas reinfecciones, éstos presentan una menor importancia clínica en los animales. Aunque estos animales mostraron porcentajes inferiores a los de los animales de 7-21 días, estos valores

fueron superiores a los descritos por otros autores, donde solo el 6,9-11,5% fueron positivos (de la Fuente *et al.*, 1999; Soilán, 2014). Esto puede deberse al escaso número de muestras analizadas en esta franja de edad (n=10). En este trabajo no se encontraron diferencias estadísticas significativas, al contrario que en los estudios anteriormente citados, lo que posiblemente se deba a un escaso número de muestras analizadas y a la falta de homogeneidad entre el número de animales muestreados en cada uno de los grupos.

Además, al considerar cada uno de los días de vida de los animales, se observó que el ternero más joven infectado tenía 3 días de edad, lo que, teniendo en cuenta el periodo de prepatencia del parásito, indica que se infectó nada más nacer, dato que coincide con otros estudios (Quílez *et al.*, 1996; Castro-Hermida *et al.*, 2002a).

Para estudiar la posible relación entre la edad y la intensidad de eliminación de *Cryptosporidium* spp., se emplearon tanto los resultados de ooquistes por campo obtenidos mediante la tinción negativa de Heine, como la valoración semicuantitativa tras inmunofluorescencia de muestras concentradas. Los valores de eliminación media de ooquistes y desviación estándar, así como los recuentos máximos y mínimos obtenidos con las dos técnicas se recogen en la Tabla 13.

**Tabla 13. Intensidad de eliminación de ooquistes de *Cryptosporidium* spp al considerar la edad, en semanas, de los terneros, mediante tinción de Heine e IFAT**

Edad	Eliminación media	Desviación estándar	Mínimo (opc)	Máximo (opc)
<b>Tinción negativa de Heine (opc)</b>				
1ª semana de vida	2,99	3,32	0,05	10,4
2ª semana de vida	1,72	1,91	0,05	5,70
3ª semana de vida	0,85	1,021	0,05	2,00
4ª semana de vida	2,10	3,55	0,05	6,20
<b>IFAT (valoración semicuantitativa)</b>				
1ª semana de vida	2,944	1,21		
2ª semana de vida	3,60	0,5164		
3ª semana de vida	3,50	0,577		
4ª semana de vida	2,60	0,8944		

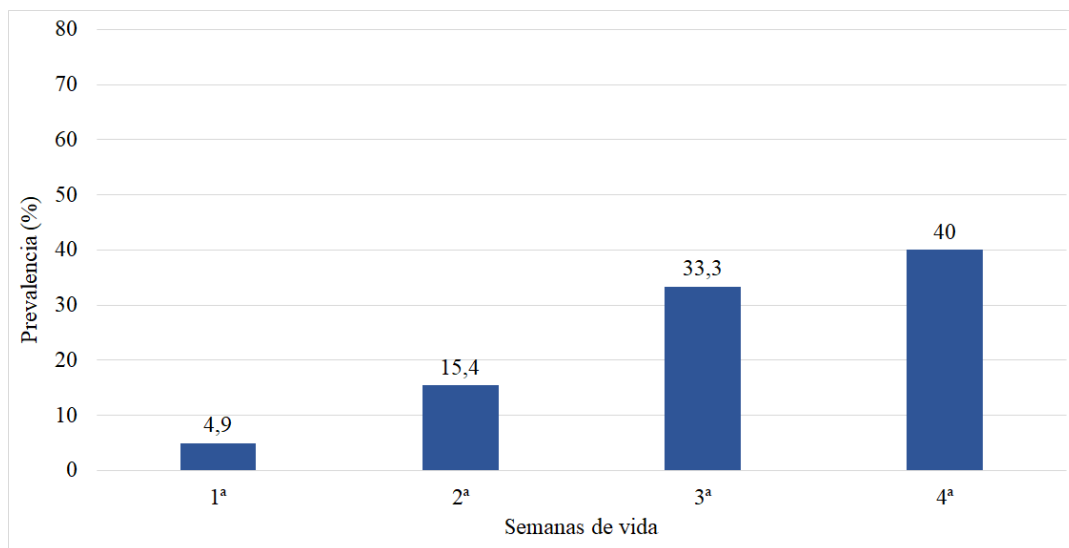
Al analizar los resultados obtenidos mediante la tinción negativa de Heine, se observó que los animales más jóvenes presentaron la mayor intensidad de eliminación, que disminuyó progresivamente para aumentar de nuevo en la 4ª semana de vida, aunque no se encontraron

diferencias significativas ( $\chi^2 = 2,286$ ;  $p = 0,515$ ). Mediante IFAT se apreció un patrón de eliminación diferente y similar al observado en las prevalencias, pues la intensidad de excreción fue máxima entre la segunda y tercera semana de vida ( $\chi^2 = 4,052$ ;  $p = 0,256$ ).

En un estudio experimental Castro-Hermida *et al.* (2002a), observaron que las tasas de eliminación media de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. más altas se encontraban en los primeros 23 días de vida de los animales, y que era entre los días 1-10 donde se registraban las eliminaciones más elevadas. Por otro lado, Soilán (2014), encontró unas tasas similares de eliminación media de ooquistes, en terneros de menos de 21 días con respecto a las observadas en este trabajo mediante IFAT. Otros estudios sitúan también un pico de eliminación a los 10 días de edad (Gillhuber *et al.*, 2014), coincidiendo con los resultados obtenidos con la técnica de referencia (IFAT).

#### *Giardia* spp.

Como se observa en la Figura 5, el porcentaje de animales que eliminaron quistes de *Giardia* spp. se incrementó progresivamente con la edad de los terneros, siendo la prevalencia significativamente más elevada en los de mayor edad ( $\chi^2 = 10,154$ ;  $p = 0,017$ ).



**Figura 5.** Prevalencia de *Giardia* spp. en terneros con diarrea al considerar la edad de los animales

Los resultados obtenidos coinciden con los observados por la mayoría de autores, que observan un incremento paulatino de la prevalencia de *Giardia* spp. desde la primera semana de vida hasta los 60-90 días de vida, y una disminución a partir de esa edad (Quílez *et al.*, 1996; Gillhuber *et al.*, 2014). Castro-Hermida *et al.* (2011) comprobaron que la prevalencia de infección disminuía con la edad, obteniendo las prevalencias más bajas en animales adultos. Al contrario que Huetink *et al.* (2001) que obtuvieron prevalencias muy reducidas en el primer mes de vida de los terneros estudiados, donde solo un animal resultó positivo (1/112).

Es necesario señalar que el animal más joven en el que se identificaron quistes tenía tan solo 5 días de edad. Se ha descrito que los animales pueden excretar quistes 3 días tras la ingestión de formas parasitarias (Thompson y Monis, 2012). Además, en un estudio realizado por Guillhuber *et al.* (2014) el ternero más joven positivo tenía tan solo 3 días. Todo ello implicaría que, en nuestro estudio, el ternero que eliminó quistes con 5 días se infectó durante los dos primeros días de vida.

Al estudiar la posible asociación entre la edad y la intensidad de eliminación de quistes de *Giardia* spp. (Tabla 14) no se apreció un patrón definido, y las diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $\chi^2=3,263$ ;  $p=0,353$ ).

**Tabla 14. Relación entre la intensidad de eliminación de *Giardia* spp. y la edad, mediante IFAT (valoración semicuantitativa)**

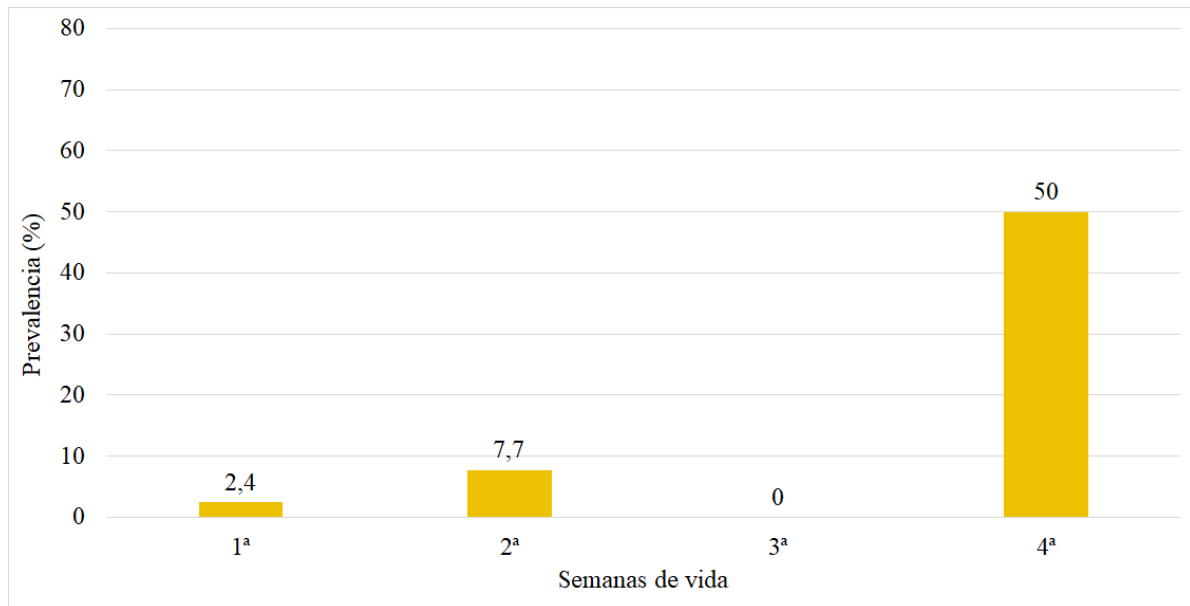
Edad	Eliminación media	Desviación estándar
1ª semana de vida	3,0	1,41
2ª semana de vida	1,5	0,71
3ª semana de vida	3,0	1,41
4ª semana de vida	1,750	0,95

Los resultados de eliminación contrastan con los hallados en otros estudios que muestran una eliminación muy reducida en la primera semana, que va incrementándose hasta alcanzar un pico máximo en la segunda semana, para después comenzar a descender (Xiao, 1994); estos animales de mayor edad presentarían prevalencias de infección altas, de en torno al 40-90%, y tasas de eliminación mucho más bajas.

La eliminación tan dispar observada en este trabajo puede deberse a la diferencia en el número de animales muestreados para cada grupo de edad, y al patrón de eliminación intermitente de quistes que sigue este protozoo, pudiendo haber obtenido falsos negativos y un sesgo en la intensidad de eliminación.

#### *Eimeria* spp.

Como se observa en la Figura 6, el porcentaje de animales infectados por este coccidio aumentó, por lo general, con la edad, observándose los valores más elevados en los animales de 4 semanas de vida, al igual que en *Giardia* spp. Estas diferencias fueron significativas ( $\chi^2 = 21,26$ ;  $p < 0,001$ ). La ausencia de animales positivos hallado en los terneros de tres semanas de vida puede deberse al escaso número de muestras obtenidas en este grupo de edad, tan solo seis.



**Figura 6.** Prevalencia de *Eimeria* spp. en terneros con diarrea de Galicia al considerar la edad

Los resultados observados concuerdan con los que cabría esperar, ya que las infecciones por coccidios eiméricos son más frecuentes entre las 3 semanas y 6 meses de vida (Díaz *et al.* 2013) y es normal observar prevalencias elevadas en la cuarta semana de vida. Un hecho difícil de explicar es que el animal positivo más joven tenía tan solo 7 días, se ha registrado un periodo de prepatencia para *E. alabamensis* de entre 6-10 días (von Samson-Himmelstjerna *et al.*, 2006), lo que podría explicar este hallazgo.

Al analizar la influencia de la edad sobre la intensidad de eliminación de ooquistes de *Eimeria* spp., se observó que, al igual que la prevalencia, los recuentos de ooquistes por gramo de heces aumentaban con la edad (Tabla 15), aunque no se hallaron diferencias estadísticamente significativas ( $\chi^2 = 1,029$ ;  $p = 0,598$ ). Los valores de eliminación observados en la primera y segunda semanas de vida corresponden a un único ternero en cada grupo.

**Tabla 15.** Relación entre la intensidad de eliminación (opg) y la edad, mediante la técnica de MacMaster

Edad	Eliminación media (opg)	Desviación estándar	Mínimo (opg)	Máximo (opg)
1ª semana de vida	450	0	450	450
2ª semana de vida	2.333	0	2.333	2.333
3ª semana de vida	0			
4ª semana de vida	6.775	8.498,86	100	21.100

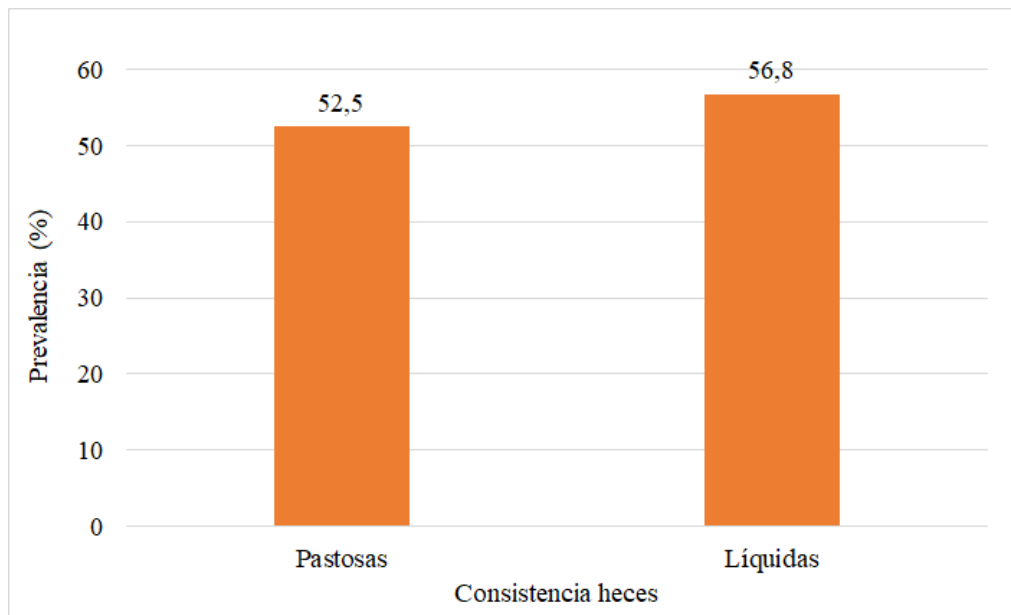
Lassen *et al.* (2009), observaron en terneros menores de 3 meses una eliminación media de 1.119 opg. Otros estudios realizados por Enemark *et al.* (2013) mostraron una eliminación media de 2.040 opg en animales con edades comprendidas entre 3 semanas y 6 meses de vida. En otros estudios si se observaron diferencias significativas entre la edad y la eliminación media de ooquistes por gramo (Lassen *et al.*, 2009); Koutny *et al.* (2012) demostraron una asociación negativa entre la edad de los animales y la eliminación media de ooquistes por gramo, pero también observaron que a medida que los animales crecían aumentaba el número de animales que excretaban ooquistes.

#### 4.3.2. Estado de las heces

Según los resultados obtenidos de los 84 animales muestreados, 44 presentaban heces líquidas frente a los 40 que presentaron heces pastosas. La relación entre la consistencia de las heces y cada agente estudiado se realizó por separado.

##### *Cryptosporidium* spp.

El porcentaje de muestras positivas a *Cryptosporidium* spp. fue superior en aquellas de consistencia líquida que en las pastosas (Figura 7). Sin embargo estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $\chi^2 = 0,158$ ;  $p=0,691$ ).



**Figura 7. Prevalencia (%) de *Cryptosporidium* spp. según la consistencia de las heces**

En numerosos estudios se establecen relaciones estadísticas significativas entre la consistencia de las heces y la prevalencia de infección por *Cryptosporidium* spp. (García-Meniño, 2013; Soilán, 2014); siendo la prevalencia significativamente más elevada en animales

con heces líquidas. Que no se hayan encontrado diferencias significativas puede deberse al bajo número de muestras analizadas. Sin embargo, las prevalencias observadas en ambos grupos son muy superiores a las encontradas en otros estudios donde se analizaron muestras de terneros lactantes sin diarrea (García-Meniño, 2013; Valderrey, 2017).

Al considerar el efecto de la consistencia de las heces sobre la intensidad de eliminación de ooquistes de *Cryptosporidium* spp., se observó que los recuentos de ooquistes fueron más elevados en las heces pastosas cuando se usó la tinción negativa de Heine, mientras que con IFAT se observó lo contrario (Tabla 16). Estas diferencias no fueron significativas en ninguno de los dos casos ( $\chi^2 = 0,488$ ;  $p = 0,485$  Heine;  $\chi^2 = 2,868$ ;  $p = 0,090$  IFAT).

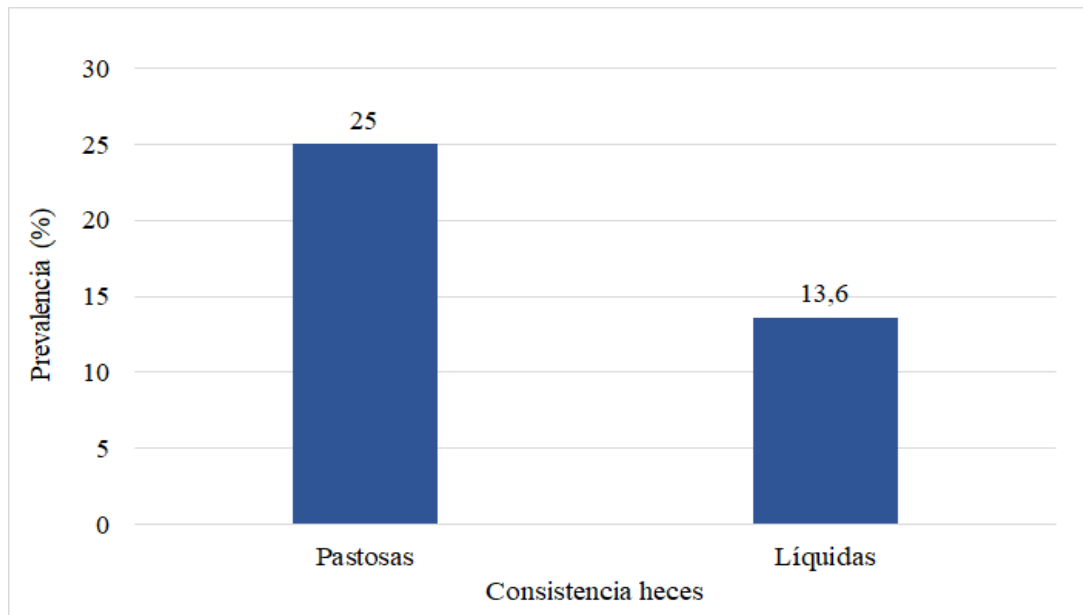
**Tabla 16. Intensidad de eliminación de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en terneros con diarrea en Galicia al considerar la consistencia de las heces**

Consistencia heces	Eliminación media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
<b>Tinción negativa de Heine (opc)</b>				
Pastosas	3,01	3,423	0,05	10,4
Líquidas	1,32	1,51	0,05	6,3
<b>IFAT (valoración semicuantitativa)</b>				
Pastosas	2,727	1,2025		
Líquidas	3,280	1,021		

La intensidad de eliminación calculada mediante la tinción negativa de Heine fue superior en las heces pastosas, lo que puede deberse a que las heces diarreicas tienen un mayor porcentaje de agua que las pastosas, pudiendo actuar ésta como diluyente, subestimando así el número de ooquistes observados en cada campo. Los resultados obtenidos con la IFAT muestran una mayor eliminación media en animales con diarrea; estas discrepancias pueden estar relacionadas con el proceso de concentración, que aumenta la sensibilidad de la técnica, y a la clasificación semicuantitativa que se realizó.

#### *Giardia* spp.

Se halló un mayor porcentaje de muestras positivas a *Giardia* spp. entre las heces de consistencia pastosa (25,0%) que en las líquidas (13,6%) (Figura 8), aunque con Chi cuadrado se constató que estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $\chi^2 = 1,755$ ;  $p = 0,185$ ).



**Figura 8.** Prevalencia (%) de *Giardia* spp. según la consistencia de las heces

Los resultados obtenidos concuerdan con el patrón de este agente, ya que es más característica la eliminación de heces más o menos pastosas, así como la alternancia con heces líquidas. Estos resultados coinciden con los descritos por Quílez *et al.* (1996), donde observaron tasas de infección mayores en animales sin diarrea.

Aunque la eliminación media de quistes de *Giardia* spp. fue moderada independientemente de la consistencia de las heces, la eliminación media fue ligeramente superior en las muestras líquidas (Tabla 17). Con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis se constató que las diferencias no eran estadísticamente significativas ( $\chi^2 = 0,465$ ;  $p = 0,496$ ).

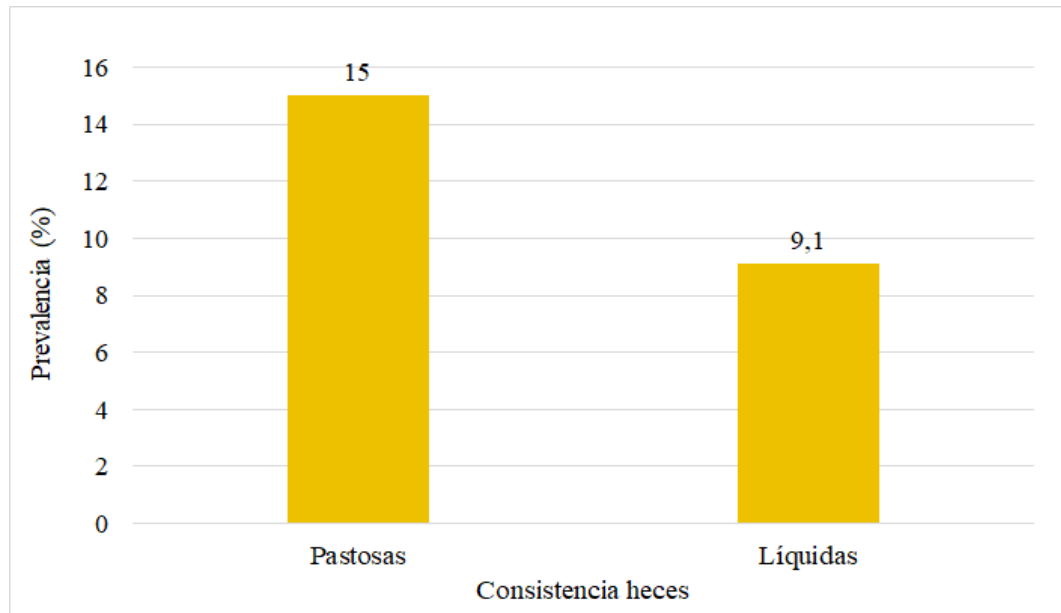
**Tabla 17.** Intensidad de eliminación de quistes de *Giardia* spp., obtenidos mediante IFAT (valoración semicuantitativa), en terneros con diarrea en Galicia al considerar la consistencia de las heces

Consistencia heces	Eliminación media	Desviación estándar
Pastosas	2	1,05
Líquidas	2,33	1,03



*Eimeria* spp.

Los resultados muestran (Figura 9) que la presencia de ooquistes de *Eimeria* spp. es más frecuente en heces pastosas (6/40) que en las de consistencia líquida (4/44), aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $\chi^2 = 0,698$ ;  $p=0,404$ ).



**Figura 9.** Prevalencia (%) de *Eimeria* spp. según la consistencia de las heces

Para que un animal que excrete coccidios tenga diarrea las especies implicadas tienen que ser patógenas; si por el contrario son especies apatógenas, la eliminación de ooquistes tendría que ser muy elevada y padecer una infección mixta con especies patógenas para observar signos clínicos. Los resultados obtenidos coinciden con lo observado en la mayoría de estudios, en los que los porcentajes de animales que no presentan diarrea son superiores con respecto a los que si la padecen (Lassen *et al.*, 2009; Enemark *et al.*, 2013; Dauschies y Najdrowski, 2005; Forslid *et al.*, 2015).

Los recuentos de ooquistes por gramo más elevados se detectaron en las muestras de heces líquidas (Tabla 18), pero no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $\chi^2 = 0,182$ ;  $p=0,670$ ). Estos resultados coinciden con los señalados por Enemark *et al.* (2013), que observó que la presencia de heces líquidas suele estar significativamente relacionado con una mayor eliminación media de opg; además otros autores identificaron una mayor eliminación de opg en heces diarreicas (Bangoura *et al.*, 2011; Koutny *et al.*, 2012; Enemark *et al.*, 2013).

**Tabla 18. Intensidad de eliminación de ooquistes de *Eimeria* spp., mediante la técnica de MacMaster (opg), en terneros con diarrea en Galicia al considerar la consistencia de las heces**

<b>Consistencia heces</b>	<b>Intensidad media (opg)</b>	<b>Desviación estándar</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
Pastosas	4.693	7.521,9	50	19.850
Líquidas	7.675	9.534,5	100	21.100

#### **4.4. Comparación entre las técnicas empleadas para la detección de ooquistes de *Cryptosporidium* spp.**

El objetivo de comparar las dos técnicas utilizadas en la detección de este patógeno se debe a que la tinción negativa de Heine es una técnica más rápida, sencilla y económica que la IFAT, pero sus valores de sensibilidad y especificidad son mucho más reducidos. Determinar el nivel de concordancia entre ellas podría simplificar de forma notable el diagnóstico parasitológico; además, sería muy útil poder realizarla con garantía de obtener unos resultados fiables en un primer cribado de las muestras.

Al considerar todas las muestras se observó que el nivel de concordancia entre los resultados obtenidos con la tinción negativa de Heine y los obtenidos con la IFAT era moderada (Tabla 19). Sin embargo cuando se tuvieron en cuenta solo las muestras de consistencia pastosa el nivel de concordancia entre las dos técnicas resultó débil, obteniendo con la tinción negativa de Heine once falsos negativos, y teniendo un mayor grado de sensibilidad la IFAT. Finalmente, al tener en cuenta las muestras de consistencia líquida se observó una buena concordancia entre las dos técnicas, lo que indica que si las muestras a analizar son de consistencia líquida, la tinción negativa de Heine podría asegurar niveles de sensibilidad y especificidad aceptables y fiables para realizar un primer diagnóstico.

**Tabla 19. Resultados obtenidos al comparar las técnicas empleadas para la detección de *Cryptosporidium* spp. según el grupo analizado**

<b>Grupo analizado</b>	<b><math>\kappa</math></b>	<b>p</b>	<b>Nivel de concordancia</b>
<b>Total de animales</b>	0,532	< 0,001	MODERADO
<b>Animales con heces pastosas</b>	0,312	0,032	DÉBIL
<b>Animales con diarrea</b>	0,729	< 0,001	BUENO

## 5. Conclusiones

1. Los protozoos *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. y *Eimeria* spp. están involucrados en un elevado porcentaje (64,3%) de las diarreas que afectan al ternero neonato.

2. *Cryptosporidium* spp. es un enteropatógeno muy prevalente (54,8%) en los procesos diarreicos del ternero, mientras que *Giardia* spp. y *Eimeria* spp. se identificaron en menor proporción.

3. Las infecciones simples fueron las más frecuentes (72,2%), seguidas de las dobles (22,2%), y las triples (5,6%). La asociación más común fue la integrada por *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp.

4. Se identificaron 9 especies de *Eimeria*: *E. alabamensis*, *E. auburnensis*, *E. bovis*, *E. canadensis*, *E. cylindrica*, *E. ellipsoidalis*, *E. subspherica*, *E. wyomingensis* y *E. zuernii*. Presentando mayor prevalencia *E. ellipsoidalis* (35,66%), *E. bovis* (33,65%), *E. zuernii* (13,15%) y *E. auburnensis* (11,76%).

5. La prevalencia de infección por *Giardia* spp. y *Eimeria* spp. se incrementó significativamente con la edad de los animales. Por el contrario, la consistencia de las heces no influyó en los porcentajes de infección.

6. Al analizar heces líquidas, la tinción negativa de Heine, rápida, barata y sencilla, muestra una buena concordancia con la técnica de referencia (inmunofluorescencia directa); por ello, en este tipo de muestras la tinción de Heine podría emplearse como método de cribado inicial.

## 6. Bibliografía

- Bangoura, B.; Dauschies, A. (2011) 'Prevalence of *Eimeria bovis* and *Eimeria zuernii* in German Cattle Herds and Factors Influencing Oocyst Excretion', *Parasitology Research*, 109(S1): 129–138.
- Berrilli, F.; Di Cave, D.; De Liberato, C.; Franco, A.; Scaramozzino, P.; Orecchia, P. (2004) 'Genotype characterisation of *Giardia duodenalis* isolates from domestic and farm animals by SSU-rRNA gene sequencing.', *Veterinary parasitology*, 122(3): 193–199.
- Bowman, D. D., (2009) 'Georgis' Parasitology for Veterinarians.' Ed. Saunders Elsevier.
- Cacciò, S. M.; Sprong, H. (2001) 'Epidemiology of Giardiasis in Humans.' En: Lujan, H. D., Svärd, S. (Eds.) En: 'Giardia: A Model Organism'. Springer Wien New York, pp. 17-26.
- Cardona, G. A.; de Lucio, A.; Bailo, B.; Cano, L.; de Fuentes, I.; Carmena, D. (2011) 'Identification and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* in children and cattle populations from the province of Álava, North of Spain', *Science of The Total Environment*, 412–413: 101–108.
- Castro-Hermida, J. A.; Almeida, A.; González-Warleta, M.; Correia da Costa, J. M.; Rumbo-Lorenzo, C.; Mezo, M. (2007) 'Occurrence of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* in healthy adult domestic ruminants', *Parasitology Research*, 101(5): 1443–1448.
- Castro-Hermida, J. A.; Carro-Corral, C.; Gonzalez-Warleta, M.; Mezo, M. (2006) 'Prevalence and Intensity of Infection of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in Dairy Cattle in Galicia (NW Spain)', *Journal of Veterinary Medicine Series B*, 53(5): 244–246.
- Castro-Hermida, J. A.; García-Presedo, I.; Almeida, A.; González-Warleta, M.; Da Costa, J. M.; Correia Mezo, M. (2011) '*Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in two areas of Galicia (NW Spain)', *Science of the Total Environment*, 409: 2451-2459.
- Castro-Hermida, J. A.; González-Losada, Y. A.; Ares-Mazás, E. (2002b) 'Prevalence of and risk factors involved in the spread of neonatal bovine cryptosporidiosis in Galicia (NW Spain)', *Veterinary Parasitology*, 106 (1): 1–10
- Castro-Hermida, J. A.; González-Losada, Y. A.; Mezo-Menéndez, M.; Ares-Mazás, E. (2002a) 'A study of cryptosporidiosis in a cohort of neonatal calves', *Veterinary Parasitology*, 106(1): 11–17.
- Chako, C.Z.; Tyler, J.W.; Schultz, L.G.; Chiguma, L.; Beerntsen, B.T. (2010) 'Cryptosporidiosis in People: It's Not Just About the Cows', *Journal of Veterinary Internal*

- Medicine*, 24 (1): 37-43.
- Current, W. L.; García, L. S. (1991) 'Cryptosporidiosis.', *Clinical microbiology reviews*, 4 (3): 325–358.
- Current, W. L.; Reese, N. C. (1986) 'A comparison of endogenous development of three isolates of *Cryptosporidium* in suckling mice.', *The Journal of protozoology*, 33 (1): 98–108.
- Dauguschies, A.; Najdrowski, M. (2005) 'Eimeriosis in Cattle: Current Understanding', *Journal of Veterinary Medicine Series B*, 52(10): 417–427.
- de Graaf, D. C.; Vanopdenbosch, E.; Ortega-Mora, L. M.; Abbassi, H.; Peeters, J. E. (1999) 'A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals.' *International Journal for Parasitology*, 29 (8): 1269-1287.
- de la Fuente, R.; García, A.; Ruiz-Santa-Quiteria, J. A.; Luzón, M.; Cid, D.; García, S.; Orden, J. A.; Gómez-Bautista, M (1998) 'Proportional morbidity rates of enteropathogens among diarrheic dairy calves in central Spain', *Preventive Veterinary Medicine*, 36(2): 145–152.
- de la Fuente, R.; Luzón, M.; Ruiz-Santa-Quiteria, J. A.; García, A.; Cid, D.; Orden, J. A.; García, S.; Sanz, R.; Gómez-Bautista, M. (1999) 'Cryptosporidium and concurrent infections with other major enteropathogens in 1 to 30-day-old diarrheic dairy calves in central Spain', *Veterinary Parasitology*, 80(3): 179–185.
- Díaz, V.; Campos, M.; Lozano, J.; Mañas, I.; González, J. (1996) 'Aspects of animal giardiasis in Granada province (southern Spain)', *Veterinary Parasitology*, 64(3): 171–176.
- Díaz, P.; Pérez, A.; López, R.; Soilán, M.; Cabanelas, E.; Pato, F.J.; Prieto, A.; Panadero, R.; López, C. M.; Fernández, G.; Morrondo, P.; Díez-Baños, P. (2013) 'Diarreas por coccidios en xatos: un proceso que afecta moi negativamente á economía da granxa' *AFRIGA*, 107: 2-6.
- Díaz, P.; Soilán, M.; Navarro, E.; Pérez, A.; Cabanelas, E.; Prieto, A.; Díaz, J., López, C. M.; Panadero, R.; Fernández, G.; Morrondo, P.; Díez-Baños, P. (2014) 'Criptosporidiosis en ruminates.' *Ganadería*, 94: 44-48.
- Díaz, P.; Soilán, M.; Pato, F.J.; Pérez, A.; Panadero, R.; López, C.M.; Morrondo, P.; Díez-Baños, P. (2011) 'A criptosporidiose en ruminantes como causa de diarrea.' *AFRIGA*, 92: 56-62.
- Enemark, H. L.; Dahl, J.; Enemark, J. M. D. (2013) 'Eimeriosis in Danish Dairy Calves – Correlation between Species, Oocyst Excretion and Diarrhoea', *Parasitology Research*,

112(S1): 169–176.

- Faber, J.-E.; Kollmann, D.; Heise, A.; Bauer, C.; Failing, K.; Bürger, H.-J.; Zahner, H. (2002) 'Eimeria infections in cows in the periparturient phase and their calves: oocyst excretion and levels of specific serum and colostrum antibodies', *Veterinary Parasitology*, 104(1): 1–17.
- Fayer, R. Trout, J. M.; Jenkins, M. C. (1998) 'Cryptosporidium parvum infection in bovine neonates: dynamic clinical, parasitic and immunologic patterns', *International Journal for Parasitology*, 28(1): 49–56.
- Fayer, R.; Santín, M.; Trout, J. M. (2007) 'Prevalence of Cryptosporidium species and genotypes in mature dairy cattle on farms in eastern United States compared with younger cattle from the same locations', *Veterinary Parasitology*, 145(3–4): 260–266.
- Fayer, R.; Santín, M.; Trout, J. M. (2008) 'Cryptosporidium ryanae n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (Bos taurus)', *Veterinary Parasitology*, 156(3–4): 191–198.
- Fayer, R.; Santín, M.; Trout, J. M.; Greiner, E. (2006) 'Prevalence of species and genotypes of Cryptosporidium found in 1–2-year-old dairy cattle in the eastern United States', *Veterinary Parasitology*, 135(2): 105–112.
- Fayer, R.; Xiao, L. (2008) *Cryptosporidium and cryptosporidiosis*. CRC Press.
- Feng, Y.; Ortega, Y.; He, G.; Das, P.; Xu, M.; Zhang, X.; Fayer, R.; Gatei, W.; Cama, V.; Xiao, L. (2007) 'Wide geographic distribution of Cryptosporidium bovis and the deer-like genotype in bovines', *Veterinary Parasitology*, 144(1–2): 1–9.
- Feng, Y.; Xiao, L. (2011) 'Zoonotic potential and molecular epidemiology of Giardia species and giardiasis.', *Clinical microbiology reviews*. American Society for Microbiology, 24(1): 110–140.
- Forslid, A.; Christensson, D.; Dahl, J.; Grandi, G.; Enemark, J. M.D. (2015) 'Bovine eimeriosis in Swedish calves: Epidemiology and insights into sampling procedures', *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 1–2: 16–20.
- García-Meniño, I. (2013) 'Implicación de Escherichia Coli y otros enteropatógenos en la diarrea neonatal del ternero.' Trabajo de Master Universitario en Investigación en medicina y sanidad veterinaria, Lugo: Universidade de Santiago de Compostela.
- García-Meniño, I.; Díaz, P.; Gómez, V.; Navarro, E.; Pérez, A.; Cabanelas, E.; Prieto, A.; Díaz, J.; Soilán, M.; López, C.; Panadero, R.; Fernández, G.; Morrondo, P.; Díez-Baños, P.; Mora1, A. (2014) 'Diarreas neonatais en xatos: situación en Galicia.' *AFRIGA*, 113: 3-7.

- García-Preledo, I. (2012) 'Contribución de los animales domésticos y silvestres a la contaminación de aguas superficiales por *Cryptosporidium* y *Giardia*' Tesis Doctoral, Universidade de Santiago de Compostela.
- Geurden, T.; Olson, M. (2011) '*Giardia* in Pets and Farm Animals, and Their Zoonotic Potential'. En: Lujan, H. D., Svärd, S. (Eds.). En: '*Giardia: A Model Organism*'. Springer Wien New York, pp. 71-79.
- Gillhuber, J.; Rügamer, D.; Pfister, K.; Scheuerle, M. C. (2014) 'Giardiasis and other enteropathogenic infections: a study on diarrhoeic calves in Southern Germany', *BMC Research Notes*, 7(1): 1-9.
- González J. V.; Astiz, S. (2005) 'Diarreas en el ternero neonato.' Schering-Plough Animal Health.
- Heine, J. (1982). Eine einfache Nachweismethode für *Kryptosporidien* im Kot. *Zoonoses and Public Health*, 29 (4), 324-327.
- Huetink, R. E.; van der Giessen, J.W.B; Noordhuizen, J.P.T.M; Ploeger, H.W. (2001) 'Epidemiology of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* on a dairy farm', *Veterinary Parasitology*, 102(1-2): 53-67.
- Joachim, A.; Krull, T.; Schwarzkopf, J.; Dauschies, A. (2003) 'Prevalence and control of bovine cryptosporidiosis in German dairy herds', *Veterinary Parasitology*, 112(4): 277-288.
- Klockiewicz, M.; Kaba, J.; Tomczuk, K.; Janecka, E.; Sadzikowski, A. B.; Rypuła, K.; Studzińska, M.; Małeck-Tepicht, J. (2007) 'The Epidemiology of Calf Coccidiosis (*Eimeria* spp.) in Poland', *Parasitology Research*, 101(S1): 121-128.
- Koutny L, H.; Joachim, A.; Tichy, A.; Baumgartner, W. (2012) 'Bovine *Eimeria* species in Austria', *Parasitology Research*, 110(5): 1893-1901.
- Lassen, B.; Viltrop, A.; Raaperi, K.; Jarvis, T. (2009) '*Eimeria* and *Cryptosporidium* in Estonian dairy farms in regard to age, species, and diarrhoea', *Veterinary Parasitology*, 166(3-4): 212-219.
- Maddox-Hyttel, C.; Langkjær, R.B.; Enemark, H.L.; Vigre, H. (2006) '*Cryptosporidium* and *Giardia* in different age groups of Danish cattle and pigs- Occurrence and management associated risk factors.' *Veterinary Parasitology*, 141: 48-59.
- MAPAMA, Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente (2017) 'Encuestas Ganaderas, análisis del número de animales por tipos.' [en línea] disponible en <<http://www.mapama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/ganaderia/encuestas->

- ganaderas/#para4 > [consulta: 28 Noviembre 2017]
- Matjila, P.T.; Penzhorn, B.L. (2002) 'Occurrence and diversity of bovine coccidia at three localities in South Africa', *Veterinary Parasitology*, 104 (2): 93-102.
- Mendonça, C.; Almeida, A.; Castro, A.; de Lurdes Delgado, M.; Soares, S.; Correia da Costa, J. M.; Canada, N. (2007) 'Molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* isolates from cattle from Portugal', *Veterinary Parasitology*, 147(1–2): 47–50.
- Olson, M. E.; O'Handley, R. M.; Ralston, B. J.; McAllister, T. A.; Andrew Thompson, R.C. (2004) 'Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle', *Trends in Parasitology*, 20(4): 185–191.
- Plutzer, J.; Ongerth, J.; Karanis, P. (2010) 'Giardia taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions', *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 213(5): 321–333.
- Potters, I.; Van Esbroeck, M. (2010) 'Negative Staining Technique of Heine for the Detection of *Cryptosporidium* spp.: A Fast and Simple Screening Technique', *The Open Parasitology Journal*, 4: 1–4.
- Quílez, J.; Sánchez-Acedo, C.; del Cacho, E.; Clavel, A.; Causapé, A. C. (1996) 'Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle in Aragón (northeastern Spain).', *Veterinary parasitology*, 66(3–4): 139–146.
- Quílez, J.; Torres, E.; Chalmers, R. M.; Robinson, G.; Del cacho, E.; Sánchez-Acedo, C. (2008) 'Cryptosporidium species and subtype analysis from dairy calves in Spain', *Parasitology*, 135(14): 1613-1620.
- Reschke, C.; Schelling, E.; Michel, A.; Remy-Wohlfender, F.; Meylan, M. (2017) 'Factors Associated with Colostrum Quality and Effects on Serum Gamma Globulin Concentrations of Calves in Swiss Dairy Herds', *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 31(5): 1563–1571.
- Robertson, L. J.; Björkman, C.; Charlotte Axén, C.; Fayer, R. (2014) 'Cryptosporidiosis in Farmed Animals'. En: Cacciò S. M. y Widmer G. (Eds). En: '*Cryptosporidium*: parasite and disease'. Springer Wien Heidelberg New York Dordrecht London, pp. 149-171.
- von Samson-Himmelstjerna, G.; Epe, C.; Wirtherle, N.; von der Heyden, V.; Welz, C.; Radeloff, I.; Beening, J.; Carr, D.; Hellmann, K.; Schnieder, T.; Krieger, K. (2006) 'Clinical and epidemiological characteristics of *Eimeria* infections in first-year grazing cattle', *Veterinary Parasitology*, 136(3–4): 215–221.



- Santín, M.; Trout, J. M.; Fayer, R. (2008) 'A longitudinal study of cryptosporidiosis in dairy cattle from birth to 2 years of age', *Veterinary Parasitology*, 155(1–2): 15–23.
- Silverlås, C.; de Verdier, K.; Emanuelson, U.; Mattsson, J. G.; Björkman, C. (2010) 'Cryptosporidium infection in herds with and without calf diarrhoeal problems', *Parasitology Research*, 107(6): 1435–1444.
- Šlapeta, J. (2013) 'Cryptosporidiosis and *Cryptosporidium* species in animals and humans: a thirty colour rainbow?', *International Journal for Parasitology*, 43 (12): 957-970.
- Soilán López, M. (2014) '*Criptosporidiosis en rumiantes domésticos de Galicia: análisis genotípico y subgenotípico.*' Tesis Doctoral, Lugo: Universidade de Santiago de Compostela.
- Stewart, I. D.; Smith, R. P.; Ellis-Iversen, J. (2008) 'Eimeria species in cattle on farms in England and Wales', *Veterinary Record*, 162(15): 482–483.
- Svensson, C. (1993) 'Peripartur excretion of Eimeria oocyst by cows on Swedish dairy farms and the age of calves at first excretion.', *Acta veterinaria Scandinavica*, 34 (1): 77-81.
- Svensson, C.; Lundborg, K.; Emanuelson, U.; Olsson, S.- O. (2003) 'Morbidity in Swedish dairy calves from birth to 90 days of age and individual calf-level risk factors for infectious diseases' *Preventive Veterinary Medicine*, 58 (3-4): 179-197.
- Thompson, R. C. A.; Monis, P. (2012) 'Giardia—From Genome to Proteome', *Advances in Parasitology*, 78: 57–95.
- Thompson, R. C. A.; Palmer, C. S; O'Handley, R. (2008) 'The public health and clinical significance of Giardia and Cryptosporidium in domestic animals', *The Veterinary Journal*, 177(1): 18–25.
- Torsein, M.; Lindberg, A.; Sandgren, C. H.; Waller, K. P.; Törnquist, M.; Svensson, C. (2011) 'Risk factors for calf mortality in large Swedish dairy herds', *Preventive Veterinary Medicine*, 99 (2-4): 136-147.
- Valderrey Lomba, S. (2017) 'Prevalencia y análisis genotípico de aislados de *Cryptosporidium* procedentes de terneros lactantes sanos y con diarrea' Trabajo de Fin de Grado, Lugo, Universidade de Santiago de Compostela.
- Wang, R.; Wang, H.; Sun, Y.; Zhang, L.; Jian, F.; Qi, M.; Ning, C.; Xiao, L. (2011) 'Characteristics of *Cryptosporidium* transmission in preweaned dairy cattle in Henan; China.' *Journal of Clinical Microbiology*, 49: 1077-1082.

Xiao, L. (1994) 'Giardia infection in farm animals', *Parasitology Today*, 10(11): 436–438.